



**Facultad de Ciencias
Dpto. Biología**

TESIS DOCTORAL

Caracterización genético-clínica, algoritmos de actuación y consejo genético en pacientes con defectos congénitos de baja prevalencia (cardíacos, craneofaciales, esqueléticos y/u oculares).

Mónica Martínez García

Madrid, 2013



La Dra María José Trujillo Tiebas, adjunto del servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz.

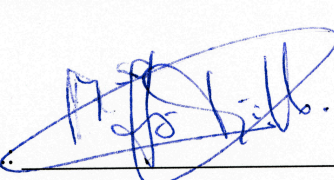
CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “*Caracterización genético-clínica, algoritmos de actuación y consejo genético en pacientes con defectos congénitos de baja prevalencia (cardíacos, craneofaciales, esqueléticos y/u oculares)*”, que presenta Doña Mónica Martínez García para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, 22 Abril de 2013

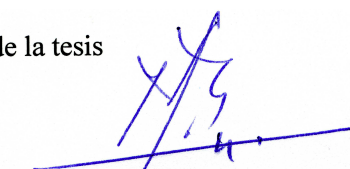
Fdo:

Director de la tesis

Fdo. 
MARÍA JOSÉ TRUJILLO TIEBAS

Fdo:

Tutor de la tesis


Fdo.: JUAN FERNÁNDEZ PIQUERO

A mi padres,

A mis hermanos y amigos,

A todos vosotros os dedico con cariño esta tesis

AGRADECIMIENTOS

Mi vocación por la genética comenzó en 1º de Bachillerato cuando descubrí un artículo sobre Craig Venter y el proyecto genoma humano en la revista "Investigación y Ciencia". Al leerlo supe enseguida a lo que me quería dedicar. Mi madre me dio un sabio consejo: "igual no llegas a ese proyecto pero llegarás a otras muchas cosas". Tras luchar con la selectividad entré en Biología en la UPV y allí tope con el profesor Don Alberto Vicario, que supo transmitir su entusiasmo por la genética humana. Me asesoró sobre dónde continuar los estudios en genética. Lo dejé todo y me marché a la capital. Sabía que era un gran paso pero lo tenía que hacer. Mi segundo ciclo en la UCM aumentó mis ganas de seguir en el campo de la genética: me pude formar en genética de poblaciones, genética de poblaciones humanas, mejora genética, ingeniería genética, biotecnología de plantas, genética del desarrollo, citogenética, citogenética evolutiva, genética del comportamiento y genética humana. Cuando terminé, fui en la búsqueda de laboratorios de genética y fue en la Fundación Jiménez Díaz donde me dieron la oportunidad. El resto de la historia, es el paso de 5 años de doctorado, riendo, llorando, sufriendo, pasándomelo bien y aprendiendo, aprendiendo realmente lo que es trabajar en genética humana, de la mano de la Dra. María José Trujillo-Tiebas que ha sido la clave principal de convertir mi vocación en una pasión.

Todo esto no lo podría haber conseguido sin aquellas personas que tanto directamente como indirectamente, me han ayudado a que esté ahora donde estoy.

Quisiera dar mi más sincera gratitud:

✓ A mi directora de tesis Dra. María José Trujillo Tiebas. Gracias por asesorarme, dirigirme y alentarme, cuando más lo necesitaba. Gracias porque tu me has mostrado nuevas formas de aprender y de enseñar. Gracias por tus conocimientos, por tus asombrosas ideas, por tu forma de transmitir y motivar con energía y pasión la genética. Gracias por tus palabras cariñosas, por tus consejos, por escucharme. Además de ser una jefa ejemplar, eres de una calidad humana única. Gracias por tu forma de ser en todos los aspectos de la vida; hace que te admire y respete a nivel profesional y personal. Para mí eres un referente a seguir. Gracias por ser mi amiga, por actuar como una madre y psicóloga para mí. Gracias por cuidarme. Gracias porque si algún día me hago llamar genetista, es gracias a ti. Definitivamente, muchísimas gracias por dejarme vivir esta experiencia a tu lado y a hacer de esta tesis una tesis Familiar. Gracias porque sin ti, no habría sido capaz. Gracias porque realmente me lo has puesto muy fácil. Podría estar toda la vida dándote gracias y de hecho, lo haré.

✓ A mi tutor José Fernández Piqueras. Gracias por tutelar esta tesis doctoral. Gracias por ser tan entrañable, por tu cariño y amabilidad.

✓ A la Dra. Carmen Ramos. Gracias por tu apoyo incondicional y por tu cariño. Gracias por cederme todos tus conocimientos, por enseñarme a transmitir las ideas en las conferencias. Gracias porque mitad de mi tesis, también te lo debo a ti. Gracias por abrirme, de par en par, el departamento de citogenética.

✓ A la Dra. Carmen Ayuso. Gracias por aceptar mi curriculum vitae hace ya 5 años y por recomendarme que trabajara para Maria José. Gracias por tus recomendaciones y por las palabras tan cariñosas que me dirigiste.

✓ A la Dra. Isabel Lorda. Gracias por todas las revisiones clínicas, por atenderme en los momentos de locura de mi tesis y ayudarme con la clínica. Gracias por darme tus consejos y por todos los regalitos que aparecían misteriosamente encima de mi mesa.

✓ A la Dra. Marta Rodríguez de Alba. Gracias por toda tu ayuda. Has sido un gran apoyo para mi. Gracias por las tardes y noches de ayuda, para que mis conferencias estuvieran perfectas. Gracias por sacarme de mis bloqueos. Gracias por abrirme la mente.

✓ A Fernando. Gracias porque has ejercido de padre muchas veces para mi y siempre me has sabido escuchar y asesorar tanto en lo profesional como en lo personal.

✓ A mis amigas Rocío, Laura y Sara. Mis niñas de cito. Ha sido genial haber vivido con vosotras todas las experiencias de locura que han sido los abortos, biopsias, MLPA, el robot etc. Gracias porque siempre tuvisteis una sonrisa en la cara y una amabilidad asombrosa. Os quiero, y espero veros durante mucho tiempo, ahora que ya no estoy al otro lado del pasillo.

Gracias al departamento de citogenética en general, por enseñarme que citogenética y molecular pertenecen a un solo campo.

✓ A mi mentora la Dra. María García Hoyos. Gracias por motivarme de ese modo como solo tu sabes hacerlo. Gracias porque durante mucho tiempo, me enseñaste la genética desde puntos de vista que no había visto, ni planteado, con anterioridad. Gracias por ayudarme con los experimentos y deducciones, gracias por tus recomendaciones, gracias por estar ahí, incluso en la distancia.

✓ A mi amiga Rosa. Gracias por tu templanza, por tus conocimientos, por tu candidez y tu forma de ser, por tu cariño y apoyo en todos los momentos. Gracias por tus recomendaciones, por tus revisiones, gracias por los momentos tanto dentro de la FJD como fuera de la FJD. Gracias por dejar lo que estabas haciendo en ese momento, para ayudarme. En general gracias por todo, por estar siempre ahí. Ezkerrik asko!!!!

✓ A mi “Tate” Diego. Gracias por convertir el día a día, en algo grandioso. Gracias por enseñarme lo que significa la amistad, porque gracias a ti volví a creer en ella. Gracias por absorber mis “kilomonis” y por traducir mi idioma. Gracias por toda tu generosidad y por compartir conmigo tus alegrías, sueños y vivencias. Gracias por tus conocimientos, que son de oro. Gracias por cambiar un día opaco, en luz blanca. Gracias por los mejores momentos de la FJD y gracias por mantener el contacto frecuente, ahora que te fuiste a Valencia.

✓ A mi amiga Patricia. Gracias por apoyarme en todo y por ser una inyección de energía todos los días. Gracias por tus razonamientos tan especiales; 24 horas no son suficientes. Gracias por llenarme con ese espíritu tan peculiar, que es único en ti. Gracias por dejarlo todo y venir a mi rescate. Estar a tu lado es especial. No puedo pensar en ti sin que se me escape una lagrima, de lo mucho que te echo de menos.

✓ A mi amiga londinense Belén Gómez. Gracias por tu locura, por tu manera de vivir, por tu espíritu. Gracias porque tu eres la alegría personificada, porque tu energía positiva es contagiosa y por todos los momentos que hemos vivido juntas en el laboratorio, en el teatro, de cañas, en España y en Londres. Gracias por que aunque te echo de menos desde el primer día que te fuiste, se que tengo una amiga para siempre en Londres. Te quiero.

✓ A Belén Benavides. Gracias por tus abrazos diarios, por tus locuras, por arrancarme una sonrisa, prácticamente todos los días. Gracias por comprenderme y por tu sinceridad. Gracias por todas las vivencias. Te deseo todo lo mejor.

✓ A Fiona. Gracias por tu sinceridad y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Gracias por haberme ayudado tanto con mi tesis, sin tu ayuda no hubiera sido de la misma forma. Gracias por facilitarme y allanarme el camino. Gracias por no permitir que me precipitara. Gracias por tus sabios consejos: Ojo!.

✓ A Marta Cortón. Gracias por enseñarme otros métodos de trabajar. Gracias por tu disponibilidad y por todo lo que me has enseñado. Gracias porque eres un ejemplo de buenas prácticas de laboratorio.

✓ A mi amigo Miguel. Gracias por ser la alegría del laboratorio. Gracias por tus conversaciones diarias tan divertidas. Gracias por tus abrazos y tus sonrisas de la mañanas. Gracias por tu perfección en los diseños gráficos y por tu ayuda con la informática. Gracias por ayudarme cuando lo necesitaba. Gracias por los momentos National Geographic y Areia.

✓ A Choni. Gracias porque eres única en los comentarios. Gracias por preocuparte por mi. Gracias por haberme enseñado en los primeros momentos de la FJD. Gracias por tu disponibilidad.

✓ A Nerea. Aunque he coincidido poco tiempo contigo, hemos conectado de una manera muy especial. Tienes una fuerza interior y una capacidad admirables. Ha sido un placer trabajar contigo y aunque ahora no estemos trabajando codo con codo, cuenta conmigo para lo que necesites.

✓ A Carmen-Laura y a Eva Ainse. Gracias por vuestro carácter tan especial, por vuestra autenticidad, alegría y por vuestra manera de plantear y resolver las dificultades. Gracias porque dais color a los días grises y por ser un buen ejemplo de eficiencia. Gracias por revolucionar el laboratorio. Gracias por que la época que estuvisteis, la hicisteis espléndida. Muchas gracias por ser así.

✓ A Sorina. Gracias por convertir las ocho de la noche y los sábados en momentos divertidos. Gracias por confiar en mí. Gracias por todo tu cariño.

✓ A Esther. Gracias por ser un ejemplo de eficiencia y eficacia en el trabajo. Porque eres “la caña”, por derivar las conversaciones durante las comidas.

✓ A Milena. Gracias por tu espíritu y por tu ayuda. Gracias por tu optimismo. Fueron especiales los momentos en los que trabajamos juntas. Muchas gracias.

✓ A Marta Cantero. Gracias por tu compañerismo, por ser una chica genial. Gracias por alegrarme todas las mañanas y por animarme con la tesis.

✓ A Carol. Gracias por tu optimismo. Gracias por hacerme ver las cosas, desde otro punto de vista.

✓ A Dani. Gracias por las risas cuando viniste a la FJD. Me hubiera encantado que hubieras sido un becario más de los nuestros, para poder compartir más tiempo. Fue genial que estuvieras por aquí.

✓ A Aurori. Gracias por tus frases únicas y maravillosas, que siempre han sido muy útiles y especiales. Gracias por tu sonrisa cada mañana. Gracias por escucharme y por tus consejos.

✓ A Cris. Gracias por ser un ejemplo de organización y por toda tu ayuda con la anoftalmia.

✓ A Berta. Gracias porque fuiste la mejor compañía que pude tener en todos los cursos a los que nos apuntábamos y no hubieran sido igual si no hubieras estado.

✓ A María Fenollar. Gracias por tu ayuda tanto con la clínica como con la genética.

✓ A Ruth. Gracias porque con tu metodología y tu manera de trabajar me has facilitado el acceso a archivos que no se hubieran podido recuperar de otro modo. Gracias porque siempre has estado dispuesta a echarme un cable.

- ✓ A Nuria. Gracias a tu trabajo me permitió avanzar de forma considerable.
- ✓ A Jesús Gallego. Gracias porque siempre tienes la herramienta adecuada para arreglar las cosas, porque siempre tienes un chiste para cada cosa, porque tu manera de trabajar impresiona. Las leyes de Mendel realmente deberían cambiarse por las leyes Gallego.
- ✓ A Dan, Ana y Elena. Gracias por vuestras enseñanzas y recomendaciones.
- ✓ A Tere y Jana. Gracias por vuestro cariño en mi etapa inicial del laboratorio.
- ✓ A los residentes Verónica, María, Paola, y Saud. Gracias por lidiar con las amplificaciones más complicadas y por vuestra disponibilidad.
- ✓ A los Doctores Carlos Santonja, Eduardo Gavin y Nacho Pastor. Gracias por vuestra ayuda con la evaluación radiológica y anatomopatológica de los abortos. Porque sois un gran ejemplo de lo que significa, multidisciplinar. Gracias por tus consejos y por tus conocimientos.
- ✓ A la familia Pérez: a Chiqui, Jaime, Blanca, y Rex. Gracias por hacerme un hueco y hacerme sentir como un miembro más de la familia todos los domingos.
- ✓ A Roberto Maldonado. Gracias por tus consejos profesionales y por todo tu apoyo. Gracias por llevar a otro nivel el concepto comercial. Gracias por toda tu ayuda.
- ✓ A Elisa. Gracias por ser alguien muy especial para mí. Gracias por los momentos “TKMO”. Gracias por los momentos especiales, por ser mi confidente, gracias por tus conversaciones diarias. Gracias por estar ahí, por escucharme.
- ✓ A mi gran amiga Gema. Gracias porque tu me ayudaste a pasar los momentos más alegres de la universidad madrileña, porque me hiciste ser una más en 1 solo día. Porque tu fuiste mi motor de apoyo, cuando me quedaba sin batería. Porque sigues tan genial como siempre. Te adoro.
- ✓ A mis amigas de la Farmacia: Mercedes, Vicky, Raquel y Eva. Gracias por enseñarme el mundo de la farmacia, porque fueron grandes momentos. Vicky para mí, tu pasión por la Farmacia, era un ejemplo de lo que yo sentía por la genética.
- ✓ A mis amigos de la UPV: Juanpa, Alberto, Pablo, Gorka, Karmele, Juncal, Clara e Itxaso. Gracias por los mejores momentos universitarios con vosotros. No hay día en que no hable de aquella época y de vosotros. Muchas gracias.

✓ A mis amigos de Madrid Santi, Sergio, Juanma, Zazo, Elena, Yoli, Paloma, Nuria, Ramón, Esther y Mariano. *Gracias por hacerme sentir del grupo desde el primer día y porque habéis sido mi vía de escape para descansar de la tesis doctoral.*

✓ A mis amig@s de Bilbao, Marta, David, Jesus, Sonia, Fatima, Isra, Mikel, Ivo, Itzi, Bea. *Gracias porque sois gente maravillosa, por hacerme sentir que nunca me marché de mi tierra.*

✓ A Jesús Rouco. *Gracias por haber sido tan especial en mi vida, por haberme apoyado en todos los momentos sobre todo en los más difíciles, cuando tuve que tomar esa gran decisión con lo que eso suponía. Gracias por haber estado siempre ahí, por contar conmigo siempre aunque esté a 500 kilómetros de distancia. Gracias por estar a mi lado. Moitas Grazas.*

✓ A Juanpe. *Gracias por ser la persona que en mi peor estado anímico ha sido capaz de sacarme una sonrisa, Gracias por darme un hogar, y por ocuparte de las cosas diarias para que pudiera terminar la tesis. Gracias por apoyarme en todos los momentos, por ser mi paño de lágrimas, de alegrías, enfados, por ser mi mitad.*

✓ A mis padres. *Gracias por vuestro sacrificio personal, por el amor incondicional, por enseñarme lo más importante de la vida, por demostrarme que con paciencia, disciplina, constancia y responsabilidad uno puede llegar lejos y porque gracias a todo lo que habéis hecho por mi habéis permitido que haya llegado donde estoy ahora y que sea la persona que soy en la actualidad.*

✓ A mi pequeño clon Sergio. *Además de ser hermanos me has hecho sentir que somos amigos, eres mi confidente y una de las personas que más me ha apoyado, entendido y lo mejor, que me ha hecho pasar los mejores momentos de mi vida. Gracias por estos años de convivencia juntos, tú lo has hecho mágico.*

✓ A mi cuasigemela Marielen. *Gracias porque siempre has sido un ejemplo a seguir, en todos los sentidos. Tu superación personal, llegar donde has llegado, ha sembrado un camino de ejemplo que yo debía seguir. Gracias por enseñarme lo que es la responsabilidad, la profesionalidad, la perfección y la constancia.*

Sin la ayuda de todos vosotros, sin la participación de los pacientes y sin los científicos que publican sus conocimientos e investigaciones en las revistas científicas no hubiera sido posible realizar esta tesis doctoral. Por último quería agradecer al proyecto financiado por la Fundación Ramón Areces y a la financiación por parte de la Fundación Conchita Rábago.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

“Incluso un camino sinuoso, difícil, nos puede conducir a la meta si no lo abandonamos hasta el final”.

Paulo Coelho (novelista, dramaturgo y letrista)

Hacer de la interrupción un camino nuevo, hacer de la caída un paso de danza, del miedo una escalera, del sueño un puente, de la búsqueda... Un encuentro.

Fernando Sabino (1923-2004)

ABREVIATURAS

AB	Resto Abortivo
ACH	Acondroplasia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMDG	Displasia acromesomélica tipo Grebe
AV	Agudeza visual
BC	Biopsia corial
BMP4	Proteína morfogenética del hueso tipo 4
CC	Cardiopatías congénitas
CCP	Condrodisplasia de costilla corta
CDMP1	Proteína morfogenética 1 derivada del cartílago
CIA	Comunicación interauricular
CIR	Crecimiento intrauterino retardado
CIV	Comunicación interventricular
CMGG	Centro de Genética Médica del Hospital Universitario de Gante
COL1A1	Cadena alfa 1 del colágeno tipo 1
COL1A2	Cadena alfa 2 del colágeno tipo 1
CNV	Variación del número de copia
DC	Defecto congénito
DGP	Diagnóstico genético preimplantacional
DODD	Displasia oculodentodigital
DP	Diagnóstico genético prenatal
DPNI	Diagnóstico prenatal no invasivo
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ECEMC	Estudio Colaborativo Español de Malformaciones congénitas
ECG	Electrocardiograma
ECS	Síndrome de Ectopia Lentis
ER	Enfermedad Rara
ESHRE	<i>European Simposium of Human Reproduction and Embriology</i>
EVC	Ellis van Creveld
FBN1	Fibrilina 1

FIV	Fecundación in vitro
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FOXC1	Acrónimo de <i>Forkhead box C1</i>
GDF5	Factor de crecimiento y diferenciación 5
GPR143	Receptor acoplado a proteína G 143
HCH	Hipocondrodisplasia
HOS	Síndrome de Holt-Oram
HPE	Holoprosencefalia
ICBDMS	Acrónimo de <i>International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems</i>
IVE	Interrupción voluntaria del embarazo
MC	Malformación congénita
MLPA	Acrónimo de <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
N/A	No aplica
N/D	No disponible
OA1	Albinismo ocular tipo 1
OCA1	Albinismo oculocutáneo tipo 1
OCA2	Albinismo oculocutáneo tipo 1
OI	Osteogénesis imperfecta
PCR	Translucencia nuchal
PITX2	Acrónimo de <i>Pituitary homeobox 2</i>
PTPN11	Acrónimo de <i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11</i>
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo Real
RNV	Recién nacidos vivos
SHH	Sonic Hedgehog
SNP	Polimorfismo de un nucleótido
STR	Repeticiones pequeñas en <i>tandem</i> : Acrónimo de <i>Short Tandem Repeats</i>
TBX1	Acrónimo de <i>T-box transcription factor 1</i>
TBX5	Acrónimo de <i>T-box transcription factor 5</i>
TN	Translucencia nuchal
TOF	Tetratología de Fallot
TYR	Tirosinasa
VC	Vellosidad Corial

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	pág. 1
1.1. Defectos congénitos	pág. 1
1.1.1. Conceptos básicos y terminología de los defectos congénitos	pág. 1
1.1.2. Prevalencia frecuencia y causa de los defectos congénitos	pág. 4
1.1.2.1. Factores ambientales	pág. 6
1.1.2.2. Factores genéticos	pág. 9
1.1.2.2.1. Anomalías cromosómicas.....	pág. 9
1.1.2.2.1.1. Síndrome de delección 22q11.2.....	pág. 13
1.1.2.2.2. Enfermedades monogénicas	pág. 15
1.1.2.2.2.1. Enfermedades monogénicas asociadas a anomalías cardíacas	pág. 16
1.1.2.2.2.1.1. Síndrome de Noonan.....	pág. 17
1.1.2.2.2.1.2. Síndrome de Marfan.....	pág. 21
1.1.2.2.2.2. Enfermedades monogénicas asociadas a anomalías esqueléticas.....	pág. 26
1.1.2.2.2.2.1. Ellis van Creveld.....	pág. 28
1.1.2.2.2.2.2. Displasia acromesomética tipo Grebe.....	pág. 30
1.1.2.2.2.2.3. Displasia oculodentodigital.....	pág. 32
1.1.2.2.2.2.4. Osteogénesis Imperfecta	pág. 34
1.1.2.2.2.2.5. Síndrome de Holt-Oram.....	pág. 37
1.1.2.2.2.3. Enfermedades monogénicas asociadas a anomalías oculares.....	pág. 39
1.1.2.2.2.3.1. Albinismo	pág. 41
1.1.2.2.2.3.1.1. Albinismo Oculocutáneo aislado	pág. 46
1.1.2.2.2.3.1.2. Albinismo Ocular ligado al X	pág. 49
1.1.2.2.2.3.2. Síndrome de Axenfeld Rieger	pág. 51
1.1.2.2.2.4. Enfermedades monogénicas asociadas a anomalías craneofaciales ..	pág. 53
1.1.2.2.2.4.1. Holoprosencefalia	pág. 54
1.1.2.2.3. Enfermedades con herencia multifactorial	pág. 56
1.2. Orientación clínica y reproductiva: Consejo Genético	pág. 57

2. OBJETIVOS	pág. 59
3. PACIENTES Y MÉTODOS.....	pág. 60
3.1. Pacientes	pág. 60
3.1.1. Pacientes estudiados.....	pág. 60
3.1.1.1. Restos abortivos estudiados	pág. 60
3.1.1.2. Familias estudiadas	pág. 64
3.1.1.2.1. Árboles genealógicos	pág. 66
3.1.1.2.1.1. Leyenda general de los árboles genealógicos.....	pág. 66
3.1.1.2.1.2. Árboles genealógicos.....	pág. 66
3.1.1.2.1.2.1. Familias con sospecha de síndrome de delección 22q11	pág. 66
3.1.1.2.1.2.2. Familias con sospecha de síndrome de Marfan	pág. 69
3.1.1.2.1.2.3. Familia con sospecha de displasia tipo Grebe	pág. 73
3.1.1.2.1.2.4. Familia con sospecha de displasia oculodentodigital	pág. 73
3.1.1.2.1.2.5. Familias con sospecha de síndrome de Holt-Oram.....	pág. 74
3.1.1.2.1.2.6. Familias con sospecha de Albinismo Oculocutáneo	pág. 76
3.1.1.2.1.2.7. Familias con sospecha de Albinismo Ocular	pág. 78
3.1.1.2.1.2.8. Familias con sospecha de Axenfeld Rieger	pág. 80
3.1.1.3. Individuos control de población española.....	pág. 81
3.2. Métodos.....	pág. 82
3.2.1. Obtención de muestras	pág. 82
3.2.1.1. Procesamiento de muestras para estudio citogenético	pág. 82
3.2.1.1.1. Cultivo celular para obtención de cariotipo	pág. 82
3.2.1.2. Procesamiento de muestras para estudio molecular	pág. 83
3.2.1.2.1. Aislamiento de ADN	pág. 83
3.2.1.2.1.1. Aislamiento de ADN a partir de sangre periférica.....	pág. 83
3.2.1.2.1.2. Aislamiento de ADN a partir de células bucales	pág. 83
3.2.1.2.1.3. Aislamiento de ADN a partir de saliva	pág. 84
3.2.1.2.1.4. Aislamiento de ADN a partir de tejido muscular.....	pág. 84

3.2.1.2.1.5. Aislamiento de ADN a partir de secciones de tejido parafinado	pág. 85
3.2.1.2.1.6. Aislamiento de ADN a partir de vellosidad Corial	pág. 86
3.2.1.2.1.7. Aislamiento de ADN a partir de líquido amniótico	pág. 86
3.2.1.2.1.8. Aislamiento de ADN fetal a partir de plasma materna	pág. 86
3.2.1.2.2. Cuantificación de ADN	pág. 87
3.2.1.2.3. Aislamiento de linfocitos.....	pág. 87
3.2.2. Técnicas citogenéticas.....	pág. 88
3.2.2.1. Cariotipo.....	pág. 88
3.2.3. Técnicas moleculares: análisis directos	pág. 88
3.2.3.1. MLPA	pág. 88
3.2.3.1.1. Empleo de kits comerciales.....	pág. 89
3.2.3.1.2. Diseño de sondas para MLPA	pág. 93
3.2.3.2. PCR.....	pág. 94
3.2.3.2.1. Gen <i>TBX1</i>	pág. 94
3.2.3.2.2. Gen <i>PTPN11</i>	pág. 96
3.2.3.2.3. Gen <i>FBNI</i>	pág. 97
3.2.3.2.4. Gen <i>EVC</i> y <i>EVC2</i>	pág. 98
3.2.3.2.5. Gen <i>CDMP1</i>	pág. 102
3.2.3.2.6. Gen <i>GJAI</i>	pág. 102
3.2.3.2.7. Gen <i>COL1A1</i>	pág. 103
3.2.3.2.8. Gen <i>TBX5</i>	pág. 104
3.2.3.2.9. Gen <i>TYR</i>	pág. 105
3.2.3.2.10. Gen <i>OCA2</i>	pág. 106
3.2.3.2.11. Gen <i>GPR143</i>	pág. 107
3.2.3.2.12. Gen <i>PITX2</i>	pág. 109
3.2.3.2.13. Gen <i>FOXC1</i>	pág. 109
3.2.3.2.14. Gen <i>SHH</i>	pág. 111
3.2.3.3. Purificación de producto de PCR	pág. 112
3.2.3.4. Secuenciación Sanger	pág. 112

3.2.3.5. Secuenciación masiva.....	pág. 113
3.2.3.6. Minisequenciación	pág. 114
3.2.3.7. Ensayo mediante enzimas de Restricción.....	pág. 116
3.2.3.8. qPCR.....	pág. 117
3.2.3.8.1. Cuantificación absoluta.....	pág. 117
3.2.3.8.2. Cuantificación relativa	pág. 117
3.2.3.9. CGH Array	pág. 119
3.2.3.9.1. CGH Array 1 Mb	pág. 119
3.2.3.9.2. CGH Array 400 Kb.....	pág. 120
3.2.3.10. QF-PCR	pág. 120
3.2.4. Técnicas moleculares: análisis indirectos.....	pág. 124
3.2.4.1. STRs	pág. 124
3.2.5. Herramientas bioinformáticas	pág. 126
3.3. Esquemas generales.....	pág. 127
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 pág. 130
4.1. Malformaciones congénitas fetales	pág. 130
4.1.1. Resultados generales	pág. 130
4.1.2. Cribado mediante aneuploidias mediante QF-PCR, cariotipo y/o MLPA	pág. 142
4.1.2.1. Anomalías cromosómicas numéricas.....	pág. 142
4.1.2.1.1. Triploidías	pág. 142
4.1.2.1.2. Trisomías	pág. 144
4.1.2.1.2.1. Trisomía 21	pág. 145
4.1.2.1.2.2. Trisomía 18	pág. 148
4.1.2.1.2.3. Trisomía 13	pág. 152
4.1.2.1.2.4. Trisomía 15	pág. 153
4.1.2.1.2.5. Trisomía 9	pág. 155

4.1.2.1.3. Monosomías.....	pág. 156
4.1.2.1.3.1. Monosomía del cromosoma X.....	pág. 156
4.1.2.1.3.2. Monosomía del cromosoma 21	pág. 159
4.1.2.2. Anomalías cromosómicas estructurales.....	pág. 163
4.1.2.2.1. Anillo del cromosoma 10	pág. 163
4.1.3. Cribado de deleciones o duplicaciones crípticas mediante arrays	pág. 164
4.1.4. Caracterización genética mediante secuenciación Sanger	pág. 173
4.1.4.1. Cribado genético de genes relacionados con cardiopatías y/o anomalías de miembros	pág. 173
4.1.4.2. Cribado genético de genes relacionados con anomalías craneofaciales.....	pág. 177
4.1.4.3. Caracterización genética de enfermedades monogénicas con afectación esquelética	pág. 178
4.1.4.3.1. Osteogénesis Imperfecta	pág. 179
4.1.4.3.2. Ellis van Creveld	pág. 184
4.1.5. Abortos sin caracterización	pág. 189
4.1.5.1. Algoritmo diagnóstico fetal	pág. 191
4.2. Malformaciones congénitas en individuos con síndromes reconocibles	pág. 193
4.2.1. Síndrome de deleción 22q11	pág. 193
4.2.2. Síndrome de Marfan	pág. 198
4.2.3. Displasia Oculodentodigital.....	pág. 209
4.2.4. Displasia Acromesomélica tipo Grebe.....	pág. 214
4.2.5. Síndrome de Holt-Oram	pág. 219
4.2.6. Albinismo	pág. 232
4.2.6.1. Albinismo Oculocutáneo	pág. 233
4.2.6.2. Albinismo Ocular tipo 1.....	pág. 253
4.2.7. Axenfeld Rieger.....	pág. 263
4.3. Orientación clínica y abordaje multidisciplinar: Consejo Genético.....	pág. 269
4.3.1. Aspectos comunicativos	pág. 269
4.3.2. Aspectos en la recogida de la información clínica	pág. 271

4.3.3. Aspectos en la recogida de muestras biológicas.....	pág. 272
4.3.4. Opciones terapéuticas y reproductivas	pág. 272
4.4. Epílogo	pág. 274
4.4.1. Futuras direcciones.....	pág. 276
5. CONCLUSIONES.....	pág. 278
6. BIBLIOGRAFÍA	pág. 282

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Estadios de desarrollo embriológico Humano. Fuente: “The Carnegie Collection”. (pág. 1)

Figura 1.2. Representación esquemática de un desarrollo normal, una malformación, una disrupción y una displasia de una determinada estructura durante el desarrollo embrionario. (pág. 3)

Figura 1.3. Tipos de presentación clínica de los defectos congénitos en el niño. (pág. 3)

Figura 1.4. Representación gráfica de las causas de las anomalías congénitas humanas. (pág. 5)

Figura 1.5. Periodo de máxima susceptibilidad a teratógenos en el período fetal. (pág. 7)

Figura 1.6. Cariotipo 46,XX normal. (pág. 9)

Figura 1.7. Locus 22q11.2: región de delección de 3 Mb y 1.5 Mb flanqueadas por secuencias LCR (low-copy-repeats) marcadas en verde. (pág. 14)

Figura 1.8. Representación esquemática del gen *PTPN11*. (pág. 18)

Figura 1.9. Ilustración de la estructura de la proteína SHP-2. (pág. 19)

Figura 1.10. Diagrama esquemático de la ruta RAS-MAPK y los genes afectados en diferentes patologías relacionadas. (pág. 20)

Figura 1.11. Estructura de la fibrilina 1. Se representan los dominios principales de la proteína: EGF, cbEGF, TB y las regiones de glicosilación. (pág. 23)

Figura 1.12. Ruta de regulación de TGF- β en una aorta madura. (pág. 24)

Figura 1.13. Representación esquemática de la orientación cromosómica y el tamaño de los genes *EVC* y *EVC2*. (pág. 29)

Figura 1.14. Representación esquemática del modelo de señalización *Evc/Evc2* propuesto en 2013. (pág. 29)

Figura 1.15. Localización de las mutaciones en la estructura monomérica de *GDF-5*. (pág. 31)

Figura 1.16. Comunicación intercelular mediante intercambio de metabolitos a través de las diferentes conexinas. (pág.34)

Figura 1.17. Modelo de estructura de las moléculas de colágeno y procolágeno. (pág.36)

Figura 1.18. Modelo de regulación transcripcional cooperativa de los factores *Nkx2.5*, *Tbx5* y *Gata4* que activan la regulación de genes relacionados con las cámaras cardíacas. (pág.38)

Figura 1.19. Anatomía del globo ocular humano. (pág.40)

Figura 1.20. Biosíntesis de melanina. (pág.42)

Figura 1.21. Melanocitos de la piel y Eptelio pigmentado de la retina. (pág.43)

Figura 1.22. Proyecciones axonales de las células ganglionares de la retina. (pág.44)

Figura 1.23. Fundoscopia del ojo derecho en: a) individuo con albinismo b) individuo normal. (pág.45)

Figura 1.24. Representación esquemática de la estructura polipeptídica y los dominios proteicos de la enzima tirosinasa. (pág.47)

Figura 1.25. Síntesis de melanosomas. (pág.50)

Figura 1.26. Manifestaciones clínicas del síndrome de Axenfeld Rieger a) microdontia y oligodontia. (pág.52)

Figura 1.27. Esquema del sistema ventricular. a) normal; b) holoprosencefalia alobar; c) holoprosencefalia semilobular; d) holoprosencefalia lobar. (pág.55)

FIGURAS PACIENTES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Representación gráfica de una sonda de MLPA. (pág.88)

Figura 3.2. Plantilla de la técnica MLPA donde en la tabla plasmada en la parte superior de la figura se clasifican las muestras (pág.92)

Figura 3.3. Plantilla de PCR empleada para la amplificación de OCA2 y GAPDH en pacientes y controles para la cuantificación relativa de los mismos mediante PCR a tiempo real. (pág.118)

FIGURAS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.1. Fracción de restos abortivos caracterizados, diferenciados por el tipo de alteración identificada y las semanas de gestación de cada aborto. (pág.133)

Figura 4.2. Representación esquemática de los abortos caracterizados en este estudio, indicando el resultado de cada caso y presentados en función de las semanas de gestación en las que fueron referidos. (pág.135)

Figura 4.3. Fotografía del feto AB-1404 (imagen izquierda) y su cariotipo en el que se observa un resultado triploide (imagen derecha). (pág.142)

Figura 4.4. Ejemplo de una fecundación diándrica y digínica que dan como resultado una triploidía. (pág.143)

Figura 4.5. Fotografía y Radiografía del feto AB-1484.(pág.145)

Figura 4.6. Resultados de QF-PCR-A y QFPCR-B donde se observan tres dosis para los marcadores del cromosoma 21. (pág.146)

Figura 4.7. Fotografías de los casos: a) AB-1162 y b) AB-2019. (pág.148)

Figura 4.8. Resultados de la QF-PCRA y QF-PCRB del caso AB-1162. (pág.149)

Figura 4.9. Fotografías del caso AB-1373. (pág.152)

Figura 4.10. Amplicones de los marcadores cromosómicos a) D15S123 y b) D15S1050, empleados en la QF-PCRC y QF-PCRD, donde se observó un patrón trisómico para estos microsatélites. (pág.154)

Figura 4.11. Fotografía y radiografía del caso AB-1241. (pág.155)

Figura 4.12. Cariotipo 47, XY+9 del caso AB-1241. (pág.155)

Figura 4.13. QF-PCRA y QF-PCRB del caso AB-1281. (pág.157)

Figura 4.14. Radiografía del caso AB-1283. (pág.157)

Figura 4.15. Patrón monosómico de los marcadores DXS1073, DXS8055 y DXS991(imagen izq.) del caso AB-1281 (imagen dcha.). (pág.157)

Figura 4.16. QF-PCRA y QF-PCRB, de la muestra AB-1256 comparada con la decidua, en la que se observa la perdida del alelo materno para los marcadores D21S1414 y D12S1411. Los marcadores de los cromosomas sexuales mostraron un patrón masculino para la muestra AB-1256. (pág.160)

Figura 4.17. Resultado de los kits p036 y p070 de MLPA para la muestra AB-1256 comparada con una muestra control donde se observa que para los amplicones correspondientes a las señales correspondientes a las sondas que hibridan en el cromosoma 21, se encuentran delecionadas en comparación con la muestra control. (pág. 161).

Figura 4.18. Análisis en multiplex de los microsatélites D21S266, D21S263, D12S11 y D12S1414 . (pág.162).

Figura 4.19. Array CGH de 1Mb de resolución ampliando la imagen a la deleción completa del cromosoma 21. (pág.162).

Figura 4.20. Indicación clínica, resultados del array CGH, genes incluidos en las regiones con CNVs del caso AB-1054 e implicación patogénica descrita de dichas CNVs. (pág.168)

Figura 4.21. Indicación clínica, fotografía y radiografía del caso AB-1123 y resultados del empleo de array CGH. (pág.169)

Figura 4.22. Indicación clínica, fotografía y radiografía del caso AB-1379, resultados del empleo de array CGH e implicación patológica de dichas CNVs. (pág.170)

Figura 4.23. Indicación clínica, fotografía, y ecografía del caso AB-1438, resultados del empleo de array CGH. (pág.171)

Figura 4.24. Indicación clínica, fotografía y radiografía del caso AB-1509, resultados tras el empleo de array CGH e implicaciones patológicas de las CNVs halladas. (pág.172)

Figura 4.25. Indicación clínica, fotografía y radiografía del caso AB-1529, resultados tras el empleo de array CGH e implicaciones patológicas de las CNVs halladas. (pág.172)

Figura 4.26. Ecografía y fotografía del caso AB-1212. (pág.180)

Figura 4.27. Ecografía y fotografía del caso AB-1687. (pág.180)

Figura 4.28. Radiografía del caso AB-1212. (pág.181)

Figura 4.29. Electroferograma de la secuencia reverse del exón 38 del gen COL1A1 de la muestra del AB-1212. (pág.182)

Figura 4.30. Electroferograma de la secuencia reverse del exón 20 del gen COL1A1 de la muestra del AB-1687. (pág.182)

Figura 4.31. Evaluación del caso AB-1889 mediante: a) radiografía donde se observa acortamiento y un ligero abombamiento bilateral de los huesos fémur y húmero, b) fotografía que muestra un feto femenino de 290g de peso y polidactilia en manos y pies y (c) corte histológico que muestra un retraso de maduración del cartílago. Artículo publicado a partir de este trabajo. (pág.185)

Figura 4.32. Electroferograma de la secuencia forward del exón 5 del gen *EVC2* de la muestra del AB-1889. (pág.187)

Figura 4.33. Electroferograma de la secuencia forward del exón 13 del gen *EVC2* de la muestra del AB-1889. (pág.187)

Figura 4.34. Algoritmo de actuación propuesto para el análisis genético de abortos malformados. (pág.192)

Figura 4.35. Normalización de las áreas de amplificación de las sondas de MLPA del kit p250, en las que se observa una disminución de al menos un 35-50% de las áreas de las sondas asociadas a los genes asociados a la región crítica del síndrome de delección 22q11.2. (pág.194)

Figura 4.36. Normalización de las áreas de amplificación de las sondas de MLPA del kit p065, en las que se observa una disminución de al menos un 35-50% de las áreas de todas las sondas asociadas al gen *FBN1*. (pág. 203).

Figura 4.37. Estudio de haplotipos de la familia Marfan-10 en la que se representa en negro el haplotipo portador de la patología. (pág.206)

Figura 4.38. Estudio de haplotipos de la familia Marfan-16 en la que se representa en negro el haplotipo portador de la patología. (pág.207)

Figura 4.39. Estudio de haplotipos de la familia Marfan-17 en la que se representa en negro el haplotipo portador de la patología. (pág.208)

Figura 4.40. Electroferograma de la mutación p.Arg148Gln, localizada en el exón 2 del gen *GJA1* y confirmada su presencia en el individuo II:2 de la familia varios-434 mediante secuenciación Sanger. (pág.211)

Figura 4.41. Electroferograma de la secuencia del exón 2 del gen *GJA1*, en la que se muestra la ausencia de la mutación p.Arg142Gln en el individuo II:3 de la familia varios-434. (pág.211)

Figura 4.42. Minisequenciación de la mutación p.Arg138Gln analizando la muestra fetal BC-3436 y la de sus progenitores individuos II:2 (indicado como padre) y II:3 (indicado como madre) de la familia varios-434. El fluorocromo marcado en FAM (azul) muestra el alelo wt y en VIC (verde) el alelo mutante. (pág.212)

Figura 4.43. Minisequenciación del límite de detección de la mutación p.Arg138Gln (imagen izquierda) y del nucleótido del cromosoma Y (imagen derecha). (pág.213)

Figura 4.44. Radiografía de los miembros inferiores y superiores del caso índice (II:1) de la familia ACH-247. (pág.214)

Figura 4.45. Electroferograma de la mutación p.Arg377Trp (indicada con una flecha) en homocigosis en el gen *CDMP-1* a partir de la muestra de ADN: II/1265 del individuo II:1 de la familia ACH-247. (pág.215)

Figura 4.46. Electroferograma de la mutación p.Arg377Trp (indicada con una flecha) en heterocigosis en el gen *CDMP-1* a partir de las muestras de ADN: II/1264 y II/1243 de los progenitores del individuo II:1 de la familia ACH-247. (pág.215)

Figura 4.47. Análisis de conservación filogenético del aminoácido Arginina en la posición 377 (sombreada en azul) de la proteína CDMP-1 en diferentes especies. (pág.216)

Figura 4.48. a);b) Estructura tridimensional de la proteína GDF-5 (P43026). c);d) Ubicación en dos ángulos del aminoácido wt (verde) que corresponde a la arginina vs el aminoácido Triptófano (en rojo) por el que cambia como consecuencia de una mutación en el codon 377 de la proteína GDF-5. (pág.217)

Figura 4.49. Mano izquierda y mano derecha del individuo IV:3 de la familia HOS-1. (pág.219)

Figura 4.50. Manos del individuo IV:4 de la familia HOS-1. (pág.219)

Figura 4.51. Electroferograma de la mutación p.Ala34Glyfs*27 generada por una inserción en heterocigosis de una guanina en el codon 34 de la proteína TBX5 indicada con una flecha. (pág.220)

Figura 4.52. Electroferograma de la mutación p.Arg279* en el exón 8 del gen TBX5, generada por una substitución en heterocigosis, de una citosina por una timina en la posición 835 del cDNA, indicada con una flecha. (pág.221)

Figura 4.53. Estructura del gen TBX5, en el que se indican la mayoría de las mutaciones descritas. Enmarcadas en recuadros rojos se representan las mutaciones identificadas en este estudio. (pág.221)

Figura 4.54. Análisis de haplotipos de los miembros de la familia HOS-1. Se representa en negro el haplotipo que se hereda junto con la mutación. (pág.223)

Figura 4.55. Normalización de las áreas de amplificación de las sondas de MLPA del kit p180. Se observa una disminución de al menos un 35-50% de la sonda correspondiente al exón 9 del gen TBX5. (pág.226)

Figura 4.56. Resultado del kit p179 de MLPA a partir de la muestra del caso índice de la familia HOS-2. Los amplicones sombreados corresponden a las sondas que hibridan en los exones codificantes del gen GLI3. (pág. 227)

Figura 4.57. Diagrama de flujo para el estudio molecular de individuos referidos con la sospecha clínica inicial de síndrome de Holt-Oram. (pág.230)

Figura 4.58. Representación esquemática de las mutaciones identificadas en los pacientes con albinismo oculocutáneo analizados en este estudio, localizándolas en los dominios proteicos de la tirosinasa. (pág.238)

Figura 4.59. Expediciones históricas de Colón hacia la Isla de Puerto Rico. Posible explicación de la aparición de la mutación p.Pro81Leu de origen Español en Puerto Rico. (pág.240)

Figura 4.60. Análisis de haplotipos empleando microsatélites polimórficos cercanos al gen TYR, y segregación familiar de las dos mutaciones identificadas en el individuo III:1 de la familia OCALB-9. (pág.241)

Figura 4.61. Análisis de haplotipos empleando microsatélites polimórficos cercanos al gen TYR, y segregación familiar de la mutación identificada en el individuo III:1 de la familia OCALB-2. (pág.243)

Figura 4.62. Esquema representativo de la estrategia molecular para determinar la presencia o ausencia de la delección de 2,7Kb frecuente en pacientes con albinismo Africanos subsaharianos. (pág.244)

Figura 4.63. Resultado de la migración electroforética de los amplicones resultantes, tras la PCR empleando simultáneamente los cebadores MHB-51, MHB 71 y MHB72 en las muestras del probandus, de la madre de éste de la familia OCALB-1, y de una muestra control. (pág.245)

Figura 4.64. PCR a tiempo real de las muestras 09/0031 (línea morada), 09/0032 (curva roja) de la familia OALB-1, así como de una muestra control (curva verde). (pág.246)

Figura 4.65. Resultado del kit p325 de MLPA en las muestras 09/0031 (probandus), 09/0032 (madre del probandus) y una muestra control. (pág.247)

Figura 4.66. Diagrama de flujo recomendado para dirigir el estudio molecular de pacientes con indicación clínica de albinismo oculocutáneo aislado. (pág.251)

Figura 4.67. Análisis de la secuencia del exón 2 en la familia OALB-1. (pág.257)

Figura 4.68. Análisis del microsatélite OA-CA en los diferentes miembros de la familia OALB-1. (pág.257)

Figura 4.69. Evaluación oftalmológica del fondo de ojo: a) de la probandus, donde se observan conos miópicos y ligera hipopigmentación en la retina adyacente a la papila con visualización de vasos coroideos en la polo posterior de ambos ojos; b) del padre, donde se observa una ligera hipopigmentación y una mácula. (pág.258)

Figura 4.70. PCR a tiempo real de la coamplificación de los genes GAPDH y SRY en la muestra DSF-119. (pág.259)

Figura 4.71. Electroferograma del exón 5 del gen PITX2: a) en la muestra 10/0814 perteneciente al individuo II:1 de la familia ANF-56, indicando con una flecha el cambio (c.[287A>C(+)]288G>C) y b) en el individuo I:1 correspondiente al padre del caso índice en el que se indica la ausencia de ambos cambios. (pág.264)

Figura 4.72. Alineamiento múltiple de la secuencia proteica PITX2, marcando la conservación interespecífica del codón 95 de la secuencia humana (Query) comparada con la de distintas especies. (pág.265)

Figura 4.73. Electroferogramas del exón 1 del gen FOXC1 correspondiente a: a) la muestra 10/1995 del individuo III:7 de la familia ANF-57, en la que se señala la presencia de la inserción GGC447ins; b) muestra de un individuo de población sin la inserción GGC447ins. (pág.266)

Figura 4.74. Cálculo de las frecuencias alélicas de la variante GGC447ins correspondiente a un amplicón de 500 pb (alelo a) y la variante sin la inserción con un amplicón de 497 pb (alelo A). (pág.266)

Figura 4.75. Diagrama de flujo para el estudio molecular de pacientes con diagnóstico clínico de Axenfeld Rieger. Modificado de Tumer et al, 2009. (pág.268)

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Agentes ambientales asociados a defectos congénitos. (pág. 8)

Tabla 1.2. Etiología de las cardiopatías congénitas. Imagen obtenida de AGarcía & Rodríguez, 2000. (pág.16)

Tabla 1.3. Criterios de Van del Burgt para diagnosticar el síndrome de Noonan. (pág.17)

Tabla 1.4. Requisitos para la clasificación de criterios clínicos según criterios clínicos de Gante revisados. (pág. 22)

Tabla 1.5. Criterios clínicos de Gante revisados (cuadro izquierdo) y los valores sistémicos (cuadro derecho) para el diagnóstico del Síndrome de Marfan. (pág.22)

Tabla 1.6. Diagnóstico diferencial del síndrome de Marfan. (pág.25)

Tabla 1.7. Nosología y clasificación de los trastornos esqueléticos de origen genético. (pág.27)

Tabla 1.8. Clasificación de la Osteogénesis Imperfecta propuesta en 1979. (pág.35)

Tabla 1.9. Tipos de albinismo, genes asociados a cada subtipo clínico y número de mutaciones descritas en cada gen en la base de datos HGMD. (pág.45)

Tabla 1.10. Tipos de albinismo oculocutáneo aislado y las manifestaciones clínicas asociadas. (pág.48)

Tabla 1.11. Genes asociados a albinismo oculocutáneo aislado, ubicación genómica y tamaño de los mismo así como los fenotipos asociados y la prevalencia de cada subtipo clínico. (pág.49)

Tabla 1.12. Anomalías craneofaciales asociadas con la holoprosencefalia. (pág. 55)

TABLAS PACIENTES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Abortos seleccionados para el estudio. (pág. 63)

Tabla 3.2. Protocolo de actuación según las patologías, los genes analizados y las familias estudiadas. (pág. 65)

Tabla 3.3. Kits (SALSAs) de MLPA empleados en el estudio. (pág. 89)

Tabla 3.4. Secuencias de las sondas de MLPA diseñadas para las regiones codificantes de los genes: OTX2, SOX2, BMP4. (pág. 93)

Tabla 3.5. Secuencias de las oligos para amplificar el gen TBX1 y las temperaturas de hibridación de los mismos. (pág. 95)

Tabla 3.6. Condiciones de amplificación de los diferentes fragmentos del gen TBX1. (pág. 95-96)

Tabla 3.7. Secuencias de las oligos de la región codificante del gen PTPN11 y sus temperaturas de hibridación (Td y Th). (pág. 96)

Tabla 3.8. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen PTPN11. (pág. 97)

Tabla 3.9. *Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 4, 37, 50, 54, 56, 57 y 64 del gen FBN1 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág. 97)*

Tabla 3.10. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen FBN1. (pág. 97)*

Tabla 3.11. *Secuencias de las oligos del gen EVC y las temperaturas de hibridación. (pág. 98)*

Tabla 3.12. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón 2 al 21 del gen EVC. (pág. 99)*

Tabla 3.13. *Secuencias de las oligos para la amplificación del gen EVC2 y las temperaturas de hibridación. (pág. 100)*

Tabla 3.14. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón1 (imagen superior) y del resto de los exones codificantes (imagen inferior) del gen EVC2. (pág. 101)*

Tabla 3.15. *Secuencias de las oligos para la amplificación del gen CDMP1 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág. 102)*

Tabla 3.16. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen CDMP1. (pág. 102)*

Tabla 3.17. *Secuencias de las oligos para la amplificación del exón2 del gen GJA1 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág. 102)*

Tabla 3.18. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón 2 del gen GJA1. (pág. 103)*

Tabla 3.19. *Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 12 y 38 del gen COL1A1 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág. 103)*

Tabla 3.20. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del exones 12 y 38 del gen COL1A1. (pág. 103)*

Tabla 3.21. *Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones codificantes del gen TBX5 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág.104)*

Tabla 3.22. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen TBX5. Th: Temperatura de hibridación. (pág.104)*

Tabla 3.23. *Secuencias de las oligos para la amplificación del gen TYR y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág.105)*

Tabla 3.24. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen TYR. Th: Temperatura de hibridación. y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág.105)*

Tabla 3.25. *Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 6, 7 y 13 del gen OCA2 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág.106)*

Tabla 3.26. *Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen OCA2. (pág.106)*

Tabla 3.27. *Secuencias de las oligos para la amplificación de la región de 2,7 kb del exón 7 del gen OCA2 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág.106)*

Tabla 3.28. *Condiciones de amplificación del fragmentos de 2,7 kb del exón 7 del gen OCA2. (pág.107)*

Tabla 3.29. *Secuencias de las oligos para la amplificación de la región codificante del gen GPR143 y las temperaturas de hibridación (Td y Th) de los mismos. (pág.107)*

Tabla 3.30. Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón 1a (imagen superior), exón 1b (imagen central) y de los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (imagen inferior) del gen GPR143. (pág.108)

Tabla 3.31. Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 5 y 6 del gen PITX2 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág.109)

Tabla 3.32. Condiciones de amplificación de los exones 5 y 6 del gen PITX2. Th: Temperatura de hibridación. (pág.109)

Tabla 3.33. Secuencias de las oligos para la amplificación del gen FOXC1 y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. (pág.110)

Tabla 3.34. Condiciones de amplificación de los fragmentos 1a (imagen superior), de los fragmentos 1b y 1c (imagen central) y del fragmento 1d (imagen inferior) del gen FOXC1. (pág.110)

Tabla 3.35. Secuencias y las temperaturas de hibridación (Th) de los oligos para la amplificación del gen SHH. (pág.111)

Tabla 3.36. Condiciones de amplificación de los exón 1, 2 y el fragmento 3a (imagen superior), del fragmento 3b (imagen central) y del fragmento 3c (imagen inferior) del gen SHH. (pág.111)

Tabla 3.37. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos de la reacción de secuenciación. (pág.113)

Tabla 3.38. Secuencias de los oligos del fragmento de 187 pb del exón 2 gen GJA1 para la amplificación de dicho fragmento a partir de ADN fetal procedente de plasma materno previa a la minisequenciación y la temperatura de hibridación de los cebadores (Th). (pág.114)

Tabla 3.39. Condiciones para la amplificación del fragmento de 187 pb del exón 2 gen GJA1 previa a la minisequenciación. Th: Temperatura de hibridación. (pág.114)

Tabla 3.40. Secuencias y concentración de la sonda CONN43 empleada en la minisequenciación. (pág.115)

Tabla 3.41. Condiciones para la reacción de minisequenciación. (pág.115)

Tabla 3.42. Enzimas de restricción utilizadas, dianas que reconocen y condiciones de la digestión. (pág.116)

Tabla 3.43. Reactivos de la digestión. El volumen final de la reacción fueron 20 µl. (pág.116)

Tabla 3.44. Marcadores empleados para la técnica QF-PCR. (pág.121)

Tabla 3.45. Condiciones de las reacciones QF-PCR A (imagen superior), QF-PCR B y QF-PCR C (imágenes centrales) y QF-PCR D (imagen inferior). (pág.122-123)

Tabla 3.46. Microsatélites adyacentes al gen TBX5 obtenidos de la fuente de datos Geneloc. (pág.124)

Tabla 3.47. Microsatélites adyacentes al gen FBN1 descritos previamente por en 2001. (pág.124)

Tabla 3.48. Microsatélites adyacentes al gen TYR descritos previamente en 2001. (pág.125)

Tabla 3.49. Microsatélites adyacentes al gen GPR143 descritos previamente en 1995. (pág.125)

Tabla 3.50. Microsatélites adyacentes al gen SALL1 obtenidos de la fuente de datos Geneloc. (pág.125)

Tabla 3.51. Condiciones de PCR para la amplificación de los microsatélites. (pág.125)

TABLAS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.1. Restos abortivos analizados por las diferentes técnicas citogenéticas y moleculares, así como los resultados de las mismas. Lo individuos en azul muestran los individuos caracterizados. (pág.132)

Tabla 4.2. Sondas consideradas en el kit p250 de MLPA de la casa comercial MRC-Holland. (pág.195)

Tabla 4.3. Mutaciones descritas en la base de datos HGMD asociadas a los diferentes fenotipos. (pág.196)

Tabla 4.4. Resumen de resultados de pacientes con sospecha clínica de síndrome de delección 22q11 mediante el empleo del kit específico de este síndrome: columna MLPAp250 y de los resultados tras el análisis mutacional de las regiones codificantes del gen *TBX1*. (pág.196)

Tabla 4.5. Resumen de las mutaciones identificadas en el gen *FBN1* en las diferentes familias con sospecha de síndrome de Marfan; la ubicación de las mismas en el dominio proteico de la fibrilina 1; su manifestación fenotípica asociada y la referencia de la publicación donde fueron descritas las mutaciones por primera vez. (pág.201)

Tabla 4.6. Criterios clínicos de los probanda afectos de síndrome de Holt-Oram en las familias analizadas en este estudio, las mutaciones identificadas en el gen *TBX5* y los resultados de MLPA empleado (kit p179 y p180). Asimismo se indican los casos estudiados mediante CGH. (pág.225)

Tabla 4.7. Alteraciones cromosómicas identificadas por array CGH en los casos seleccionados que fueron referidos con sospecha clínica de Holt-Oram que no presentaban mutación en el gen *TBX5* ni duplicaciones o deleciones en genes relacionados con malformación de miembros. (pág.228)

Tabla 4.8. Datos clínicos de las familias con indicación de albinismo oculocutáneo aislado. Se detallan el color de pelo de cejas, pestañas, corporal y cuero cabelludo, así como, el color de la piel; los datos oftalmológicos y los antecedentes familiares en cada caso. (pág.234)

Tabla 4.9. Resumen de las mutaciones detectadas en los individuos con indicación de albinismo oculocutáneo y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger del gen *TYR* y de los exones 6, 7 y 13 del gen *OCA2* y mediante MLPA empleando el kit p235. (pág.236-237)

Tabla 4.10. Resumen de las mutaciones detectadas en el gen *GPR143* en los individuos con indicación de albinismo ocular y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger y análisis de las muestras mediante MLPA empleando el kit p054. (pág.254-255)

Tabla 4.11. Datos fenotípicos de pigmentación recogidos tras la revaluación de los individuos afectos de las familias OALB-12, OALB-15, OALB-16, OALB-17. (pág.261)

Tabla 4.12. Datos oftalmológicos y antecedentes familiares recogidos tras la revaluación de los individuos afectos de las familias OALB-12, OALB-15, OALB-16, OALB-17. (pág.261)

Tabla 4.13. Resumen de las mutaciones detectadas en los individuos con indicación de albinismo ocular revaluados para estudio genético de albinismo oculocutáneo y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger del gen *TYR* y de los exones 6, 7 y 13 del gen *OCA2* y mediante MLPA empleando el kit p235. (+/-) heterocigosis; (+/+) homocigosis. (pág.262)

RESUMEN DE LA TESIS

RESUMEN DE LA TESIS

El término defecto congénito es una denominación genérica que abarca cualquier alteración del desarrollo embrionario y fetal, a nivel psíquico, físico, funcional, sensorial, motor, molecular y metabólico. Se pueden distinguir 4 tipos de defectos: malformaciones congénitas, las deformidades, las disrupciones y las displasias. Tanto los factores genéticos como los ambientales intervienen en la aparición de dichos defectos.

El objetivo general de este trabajo fue la caracterización genético-clínica prenatal y postnatal de pacientes con defectos congénitos de baja prevalencia a nivel cardíaco, craneofacial esquelético y ocular mediante la aplicación de técnicas citogenéticas y moleculares así como el diseño de protocolos de actuación, para poder ofrecer a dichos pacientes y a sus familiares un adecuado consejo genético.

Se analizaron 43 abortos, que presentaban malformaciones congénitas cardíacas, esqueléticas, u otras alteraciones craneofaciales. En primer lugar, con independencia de la sospecha clínica inicial, se realizó el estudio de aneuploidías mediante cariotipo y QF-PCR. En los casos con resultado normal o bien hubo un fallo de cultivo celular, se realizó el estudio mediante MLPA p036 y p070 y en los casos negativos, se realizó el empleo adicional de otros MLPAs teniendo en cuenta los datos clínicos de partida. Además, se seleccionaron 7 casos para estudio mediante microarrays. Posteriormente, se secuenciaron las regiones codificantes de genes asociados a dichos defectos congénitos. De los 43 fetos se caracterizaron: 13 casos con anomalías cromosómicas numéricas, 1 caso con anomalía cromosómica estructural, 3 casos con CNVs no descritas y 3 casos con mutaciones puntuales en genes asociados a anomalías esqueléticas.

En este estudio también se analizaron genéticamente un total de 69 familias donde los miembros afectados presentaban defectos congénitos cardíacos; oculares y/o esqueléticos asociados a un síndrome clínicamente reconocible: síndrome de delección 22q11, Marfan, displasia Oculodentodigital, Holt-Oram, condrodisplasia tipo Grebe, Albinismo y Axenfeld Rieger. En la mayoría de los casos se caracterizó la principal causa de la manifestación fenotípica.

Algunas de estas familias, gracias a los resultados de la presente tesis, pudieron optar adicionalmente por diagnósticos genéticos prenatales invasivos, no invasivos y preimplatacionales. Este estudio ha supuesto la primera aproximación sistemática con abordaje genético-clínico completo de una serie de patologías de muy baja prevalencia, alguna de ellas poco estudiadas en España.

El manejo clínico multidisciplinar y el adecuado diseño genético ha permitido establecer un abordaje completo y un adecuado asesoramiento a los pacientes con defectos congénitos analizados en este estudio, abriéndoles a un campo de numerosas posibilidades como tratamientos terapéuticos y paliativos o diferentes alternativas reproductivas; opciones todas ellas que representan el camino de la medicina personalizada.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFECTOS CONGÉNITOS

1.1.1 CONCEPTOS BÁSICOS Y TERMINOLOGÍA DE LOS DEFECTOS CONGÉNITOS

El ser humano, en su afán de descifrar los procesos biológicos, ha focalizado parte de su interés en los mecanismos que subyacen en torno a la ontogenia. El desarrollo de la ciencia y tecnología ha supuesto un avance en la comprensión de los procesos intrínsecos de la embriogénesis. A consecuencia de ello, actualmente, se conoce que el desarrollo embrionario es un proceso complejo y organizado, en el que es necesaria la interacción y regulación de manera precisa de numerosos mecanismos físico-bioquímicos, y requiere la expresión secuencial y coordinada de diferentes genes a nivel espacio-temporal, para asegurar la correcta formación del individuo (*figura 1.1*).

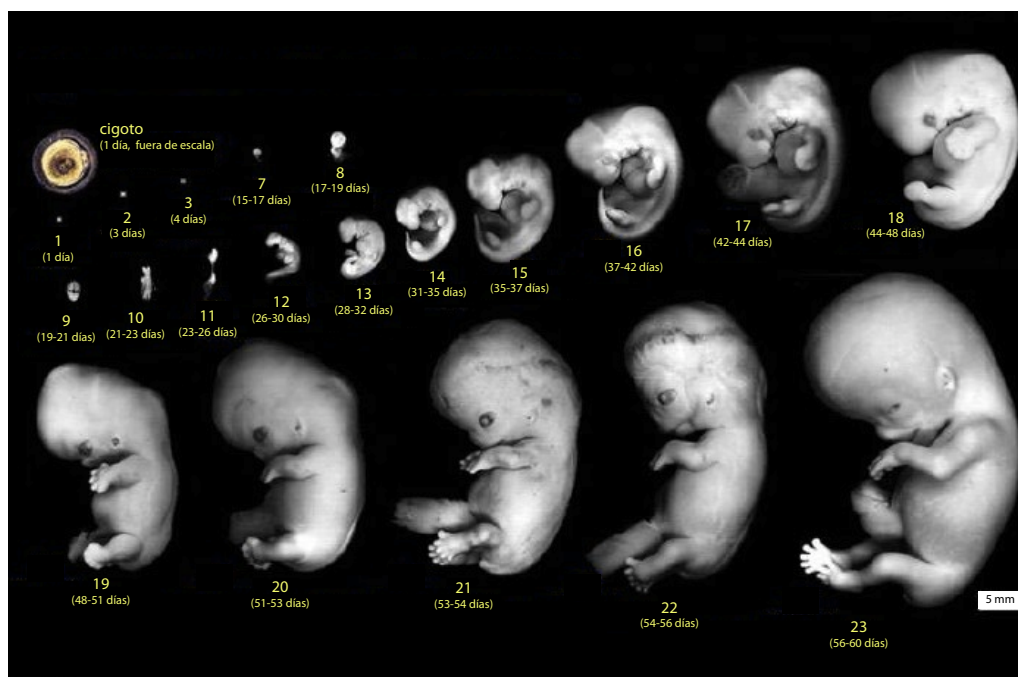


Figura 1.1. Estadios de desarrollo embriológico humano. Fuente: "The Carnegie Collection".

El progreso científico, en el estudio de las bases del desarrollo embrionario, tanto en el ser humano como en modelos experimentales, ha permitido conocer en profundidad los aspectos biológicos que pueden influir en la interrupción del proceso normal del desarrollo de un embrión y producir en consecuencia, defectos congénitos de diversa índole. El proceso de comprensión de dichos aspectos ha sido lento, debido a la elevada variabilidad existente entre individuos que presentan defectos congénitos.

El término defecto congénito (DC) es una denominación genérica que abarca cualquier alteración del desarrollo embrionario y fetal, a nivel psíquico, físico, funcional, sensorial, motor, molecular y metabólico. Según el agente o el periodo gestacional en el que ocurre la alteración, se pueden distinguir 4 tipos de defectos: las malformaciones congénitas (MC), las deformidades, las disrupciones y las displasias (Martínez-Frías, 2010) (*figura 1.2*).

✓ Las malformaciones congénitas son alteraciones morfológicas que se producen por una alteración intrínseca al propio desarrollo de cada estructura corporal del embrión, durante la morfogénesis, que abarca de la fecundación hasta la 8ª semana de gestación (o 10ª semana de amenorrea). Dentro de las malformaciones congénitas entre otros, se incluyen:

- Ausencia de órganos por falta de formación (aplasia o agenesia),
- Desarrollo deficiente de los mismos (hipoplasia),
- Aumento de su tamaño por hipercrecimiento (hipertrofia)
- Disminución del mismo por hipocrecimiento (hipotrofia),
- Alteración de su localización en el organismo (ectopia).

✓ Las deformidades son alteraciones de la morfología de estructuras una vez formadas y son originadas por fuerzas mecánicas, preferentemente durante el periodo fetal, que abarca de la 9ª semana de gestación hasta el final de la gestación.

✓ Las disrupciones (anglicismo de “destrucción”) son aquellas alteraciones de órganos o partes corporales resultado de interferencias extrínsecas que han interrumpido el proceso de desarrollo normal, principalmente durante el período fetal.

✓ Las displasias son alteraciones de la histogénesis que mayoritariamente suelen manifestarse en el periodo postnatal. Hasta la fecha, sólo algunas displasias esqueléticas con afectación ósea grave como, por ejemplo, la displasia tanatofórica y algunos tipos de acondroplasia pueden ser identificadas en el periodo neonatal.

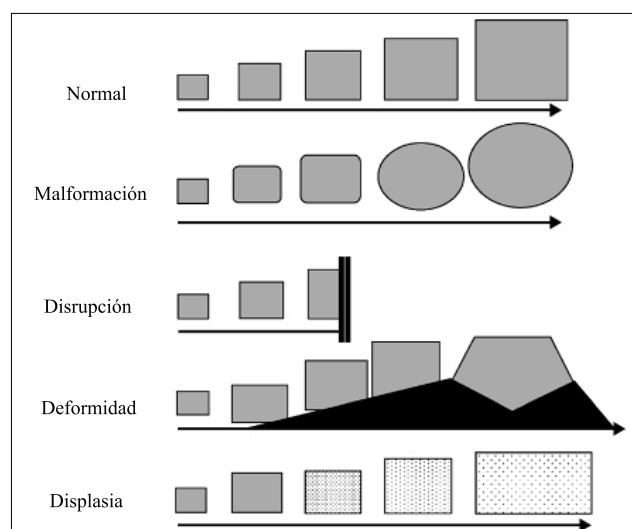


Figura 1.2. Representación esquemática de un desarrollo normal, una malformación, una disrupción y una displasia de una determinada estructura (un cuadrado pequeño) durante el desarrollo embrionario. Fuente: Uhlmann, et al, 2011.

Los defectos pueden manifestarse **aislados**, o como consecuencia de una **secuencia** (conjunto de anomalías que se derivan de una cascada de eventos a partir de una misma anomalía congénita), pueden pertenecer a un **síndrome** (conjunto de anomalías con una etiopatogenia común) o pueden formar parte de una **asociación** (conjunto de anomalías que ocurren a la vez con mayor frecuencia de la que esperada por azar únicamente, pero sin una etiopatogenia común determinada) (Martínez-Frías *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1998) (*figura 1.3*).

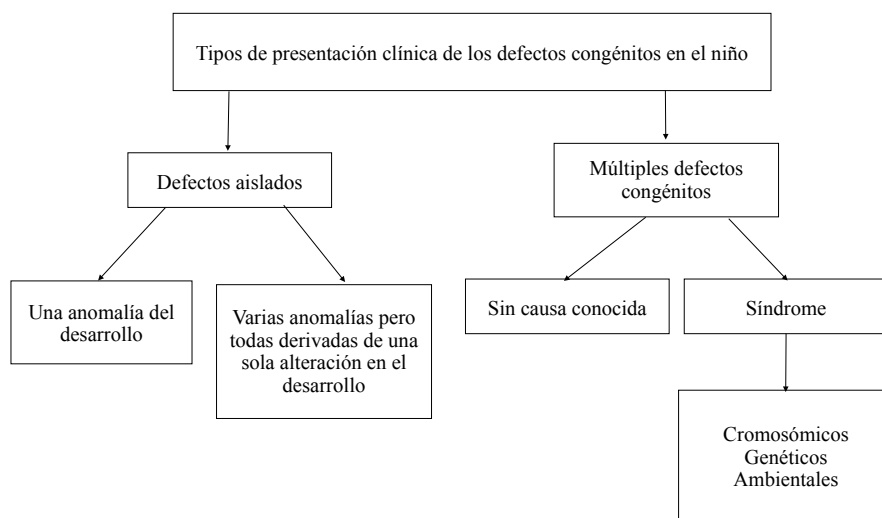


Figura 1.3. Tipos de presentación clínica de los defectos congénitos en el niño. Fuente: Martínez-Frías, 2010.

La aparición de defectos congénitos, detectados tanto prenatal como postnatalmente, produce una gran ansiedad en la familia y una enorme demanda asistencial que debe ser satisfecha y abordada por el clínico responsable, bien sea el obstetra, pediatra o genetista (Marugan & Sangrador, 2006). La disciplina de la genética clínica que se basa en el diagnóstico e interpretación de los defectos congénitos en el ser humano, particularmente aquellos que producen una alteración de la morfología del individuo, es la dismorfología (Nussbaum, *et al.*, 2007), cuyo término fue introducido por primera vez, en 1960 por el Dr David W. Smith (Guillén-Navarro & Ballesta-Martínez, 2011).

1.1.2 PREVALENCIA, FRECUENCIA Y CAUSA DE LOS DEFECTOS CONGÉNITOS

La gran mayoría de los defectos congénitos cumplen, individualmente, la definición de enfermedad rara (ER). Según la Unión Europea (UE) se entiende por Enfermedades Raras, todas aquellas enfermedades que pueden ser mortales o provocar un debilitamiento crónico del paciente y que, debido a su escasa prevalencia, requieren esfuerzos combinados para tratarlas. A título indicativo, se considera una prevalencia escasa aquella inferior a 5 casos por 10.000 habitantes (Decisión N° 1295/1999/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 1999. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 155/1. 1999).

La prevalencia global de las anomalías congénitas en el mundo industrializado, se estima en torno al 2-3% de los recién nacidos vivos, que se amplía hasta el 6-7% al incrementarse el periodo de seguimiento postnatal (Bermejo Sánchez, 2010). Además se ha estimado que alrededor del 1% de los neonatos presentan anomalías congénitas múltiples. Estas cifras hacen referencia exclusivamente a los recién nacidos vivos, sin embargo, las anomalías congénitas también se encuentran presentes en abortos terapéuticos y espontáneos, especialmente en el primer trimestre de embarazo. Las frecuencias de los defectos congénitos varía según el periodo y la región geográfica de estudio, debido a las diferencias en la influencia de factores genéticos y/o ambientales (Bermejo Sánchez, 2010).

Según los datos registrados desde 1980 por el Estudio Colaborativo Español de Malformaciones congénitas (ECEMC), la frecuencia global de recién nacidos con defectos congénitos en España se sitúa en el 1,50%. Esta frecuencia ha ido variando a lo largo del tiempo, disminuyendo progresivamente, debido a la mejora en la detección ecográfica de las anomalías congénitas (Bermejo Sánchez, 2010).

Los defectos graves son causa de abortos y muerte fetal intraútero. La presencia fetal de anomalías congénitas menores son indicadores físicos de una morfogénesis alterada, que ocurre temprano en la gestación y proporciona claves importantes para el diagnóstico. Aproximadamente el 14 % de los neonatos presentan al menos una anomalía congénita menor (Marden *et al* 1964). Aunque, las anomalías físicas menores son defectos estructurales sin relevancia clínica, su detección ecográfica puede ser un indicativo de anomalías mayores de importancia médica y puede predecir la presencia de anomalías cromosómicas, síndromes de genes contiguos, enfermedades monogénicas o bien la exposición a teratógenos durante la embriogénesis. La asociación entre anomalías congénitas mayores y menores se ha descrito en numerosos artículos y se ha observado que a mayor número de anomalías menores, mayor es el riesgo de defectos de importancia clínica (Hook *et al.*, 1976; Méhes, 1985; Leppig, *et al*, 1987)

En la actualidad, la causa de las anomalías congénitas es desconocida aproximadamente en el 50-60% de recién nacidos con defectos congénitos (*figura 1.4*), siendo por tanto conocida en el 40-50% de los casos restantes, de los cuales, se ha estimado que el 10% de los casos se debe a la influencia de factores ambientales, el 15% a factores genéticos (anomalías cromosómicas o mutaciones en genes), y el 20-25% de los casos son resultado interacción entre los factores genómicos y ambientales (Eurocat central Registry, 2004).

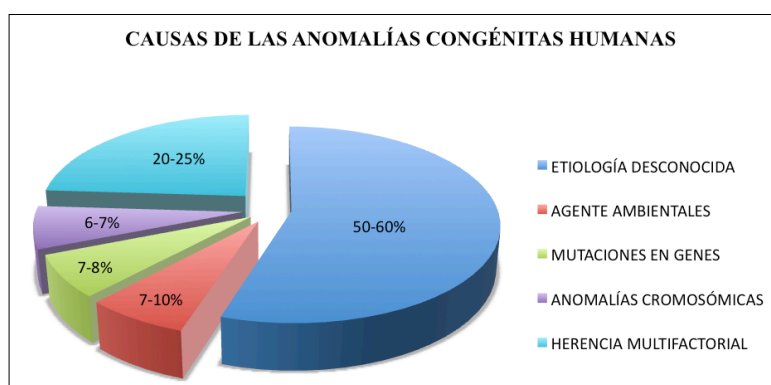


Figura 1.4. Representación gráfica de las causas de las anomalías congénitas humanas.

1.1.2.1 FACTORES AMBIENTALES

Los factores ambientales son aquellas influencias adversas, externas al organismo en desarrollo, que producen defectos congénitos. La ciencia que estudia las causas, mecanismos y manifestaciones de las alteraciones del desarrollo en su estructura y función es la teratología. La palabra teratología es un neologismo utilizado en 1832 por Geoffroy St. Hilaire (del griego τέρας, -ατος: prodigio, monstruo, y -λογία 'tratado', 'estudio', 'ciencia') (Saint-Hilaire, 1836).

Los principios de la teratología son (Wilson, 1973):

1. La susceptibilidad teratogénica depende del genotipo del embrión así como su interacción con el ambiente.
2. La susceptibilidad teratogénica varía según el estado de desarrollo (*figura 1.5*). En general, el desarrollo embrionario y fetal son susceptibles a cualquier efecto adverso, durante todo el período, acentuándose entre la 3ª y 8ª semana de gestación (Sadler & Langman, 2007)
3. Los agentes teratogénicos actúan específicamente sobre el desarrollo celular y tisular iniciando secuencias de desarrollo anormal.
4. Los efectos adversos provocados por agentes ambientales dependen de la naturaleza del agente. Las manifestaciones finales derivadas de la embriogénesis anormal son: defectos congénitos, alteraciones funcionales, retraso en el crecimiento, y muerte neonatal.
5. La susceptibilidad teratogénica depende de la duración de la exposición al factor ambiental.

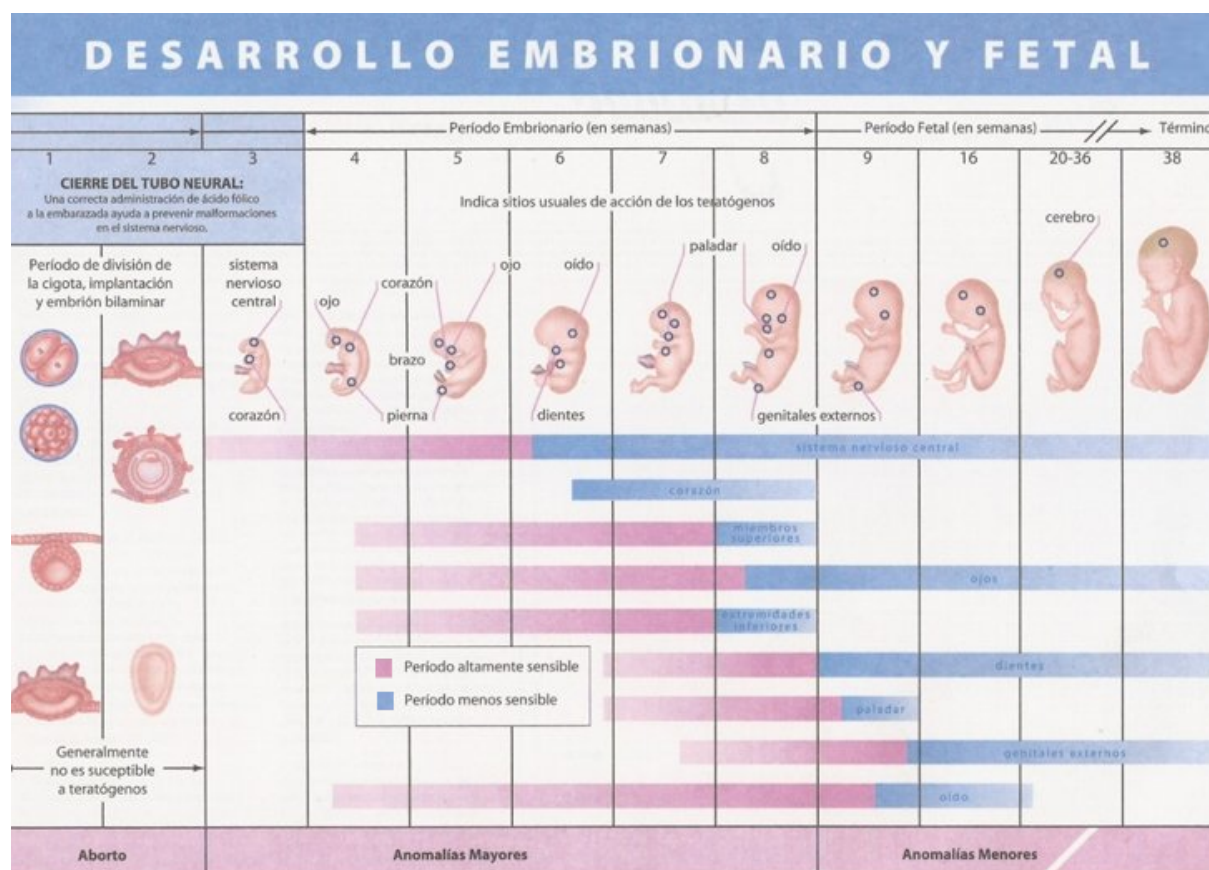


Figura 1.5. Período de máxima susceptibilidad a teratógenos en el período fetal. Fuente: Langman Embriología Médica: con orientación clínica (Sadler & Langman, 2007).

A partir de los estudios de Hale en 1933 que demostraron la asociación entre la falta de vitamina A y el desarrollo anómalo ocular, así como, de las observaciones de Gregg en 1941, que mostraron que aquellos embriones expuestos al virus de rubéola presentaban cataratas, defectos cardíacos, sordera y retraso mental y tras la asociación de la administración de talidomida en gestantes, con la aparición de anomalías de miembros en el feto (Lenz & Knapp, 1962), se han ido identificado posteriormente, infinidad de agentes que generan diferentes anomalías congénitas, tales como: agentes infecciosos, virales, químicos, hormonales, así como, carencias nutricionales, obesidad u otras enfermedades maternas (diabetes), entre otros (tabla 1.1).

	Teratógenos	Defectos Congénitos
Agentes Físicos	Hipertermia	Anencefalia, espina bífida, retraso mental, defectos faciales, cardiopatías, onfalocele, anomalías de las extremidades
	Rayos X	Microcefalia, espina bífida, paladar hendido, anomalías de los miembros
Agentes Infecciosos	Citomegalovirus	Microcefalia, ceguera, retraso mental, muerte fetal
	HIV	Microcefalia, retraso del crecimiento
	Virus del herpes simple	Microftalmia, microcefalia, displasia retiniana
	Virus de la Rubéola	Cataratas, glaucoma, defectos cardíacos, sordera, anomalías dentales
	Virus de la varicela	Hipoplasia de miembros, retraso mental, atrofia muscular
	Toxoplasmosis	Hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, microftalmia
	Sífilis	Retraso mental, sordera
Agentes Químicos	Acido valproico	Defectos en el tubo neural, cardiopatías, anomalías craneofaciales y de miembros
	Alcohol	Síndrome alcohólico fetal, hendiduras palpebrales cortas, hipoplasia maxilar, defectos cardíacos, retraso mental
	Aminopterina	Anencefalia, hidrocefalia, labio leporino y fisura paladar
	Anfetaminas	Defectos cardíacos, labio leporino y fisura paladar
	Cocaína	Retraso mental, microcefalia, trastornos de la conducta, gastrosquisis
	Difenilhidantoina (Fenitoina)	Síndrome de la hidantoína fetal: defectos faciales y retraso mental
	Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina	retraso en el crecimiento, muerte fetal
	Isotretinoína (vitamina A)	Embriopatía por vitamina A: hipoplasia mandibular
	Litio	Malformaciones cardíacas
	Mercurio Orgánico	Síntomas neurológicos similares a los de la parálisis cerebral
	Plomo	Retraso del crecimiento, trastornos neurológicos
	Solventes industriales	Fisura paladar
	Talidomida	Anomalías de extremidades, cardiopatías
	Trimetadiona	Fisura de paladar, defectos cardíacos, anomalía urogenitales y esqueléticas
	Warfarina	Condrodisplasia, microcefalia
Hormonas	Agentes androgénicos	Masculinización de los genitales femeninos, fusión de los labios genitales y hipertrofia del clítoris.
	Dietilestilbestrol (DES)	Malformaciones del útero, trompas y vagina superior, cáncer de vagina, malformación testicular
	Diabetes insulino dependiente materna	Defectos cardíacos, defectos del tubo neural
	Obesidad materna	Defectos cardíacos, onfalocele

Tabla 1.1. Agentes ambientales asociados a defectos congénitos.

1.1.2.2 FACTORES GENÉTICOS

La etiología endógena de los defectos congénitos son las anomalías cromosómicas, enfermedades de herencia monogénicas y enfermedades de herencia multifactorial (Eurocat central Registry, 2004).

1.1.2.2.1 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

En 1903, Theodor Boveri proporcionó una importante contribución a la biología, al descubrir que un número anormal de cromosomas interrumpía el desarrollo normal de un individuo e incluso conllevaba a la letalidad. Por tanto, las anomalías cromosómicas contribuyen de forma importante a la morbilidad y mortalidad en el periodo perinatal. Se estima que están presentes entre un 0.5 y un 1% de los recién nacidos vivos con defectos congénitos, en el 5 % de los mortinatos y en el 50 % de los abortos espontáneos del primer trimestre (Hassold *et al.*, 1995; Nielsen & Wohler, 1991).

En 1956, se determinó que en el ser humano, la dotación cromosómica normal de las células somáticas es diploide ($2n$ cromosomas) y está constituida por 46 cromosomas (23 pares) (*figura 1.6*): 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (XX en mujeres y XY en varones); mientras que, debido a la reproducción sexual, los gametos son haploides (n cromosomas) (Tjio, 1978).

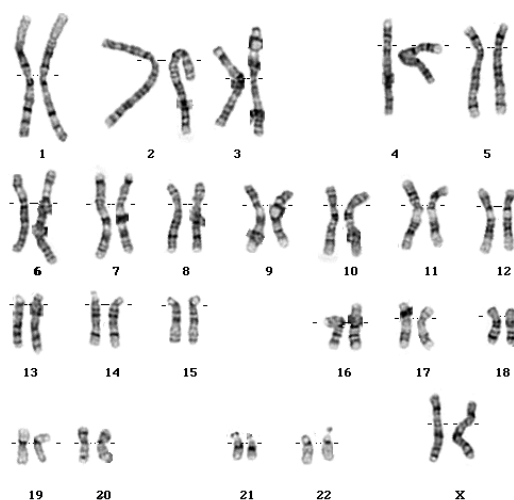


Figura 1.6. Cariotipo 46,XX normal.

En ocasiones, suceden errores en la división celular mitótica o en la división meiótica, como la no disyunción de las cromátidas o de los cromosomas, respectivamente. Esto genera la ganancia o pérdida de alguna región cromosómica o del cromosoma completo (anomalías cromosómicas numéricas) o se pueden producir roturas cromosómicas que posteriormente, se reordenan de forma inadecuada (anomalías cromosómicas estructurales).

Las anomalías cromosómicas numéricas se subdividen en dos tipos (Barch, et al., 1997):

-**Aneuploidías** : pérdida o ganancia de alguno de los cromosomas.

-**Poliploidías**: pérdida o ganancia, que afecta a la dotación cromosómica completa.

Las anomalías de tipo estructural pueden ser clasificadas:

- En función del tipo de reordenamiento:

- **Equilibradas** donde el reordenamiento cromosómico se produce sin pérdida o ganancia de material. Éstas habitualmente no cursan con un efecto fenotípico, pero los portadores de estas anomalías tienen riesgo de tener descendencia afectada con alteraciones no equilibradas, derivadas de las cromosomopatías equilibradas que generalmente, conducen a defectos congénitos.

- Anomalías estructurales **desequilibradas** son aquellas variaciones en la estructura del cromosoma que conllevan a pérdida o ganancia de material cromosómico y por lo tanto, se asocian a anomalías fenotípicas.

-En función de la estabilidad de las divisiones celulares:

-**Estables**, tales como:

- deleciones (terminales e intersticiales),
- duplicaciones, inversiones (pericéntrica y paracéntrica),
- translocaciones (robertsonianas y recíprocas),
- inserciones e isocromosomas;

-Inestables: que pueden sufrir cambios durante la división celular, produciéndose nuevos reordenamientos cromosómicos como los cromosomas dicéntricos, acéntricos y anillos.

La nomenclatura de los distintos tipos de anomalías cromosómicas está sujeta a las recomendaciones del Sistema Internacional para la Nomenclatura en la Citogenética Humana (ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature), que se establecieron por primera vez en 1977, con la idea de unificar los distintos símbolos para designar los distintos términos cromosómicos.

Las anomalías cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, pueden estar presentes en todas las células del organismo, o bien sólo en algunas líneas celulares formando mosaicos, como resultado de un error en la división celular postcigótica. La repercusión clínica dependerá de la naturaleza de la anomalía cromosómica, del estadio del desarrollo y de la línea celular implicada (Kalousek *et al.*, 1989).

En los abortos espontáneos, las anomalías cromosómicas numéricas se presentan con mayor frecuencia que las estructurales, siendo las aneuploidías de los autosomas (en concreto las trisomías) y de los cromosomas sexuales más prevalentes que las poliploidías (Hassold & Hunt, 2001). De las anomalías cromosómicas más frecuentes compatibles con la vida intrauterina se derivan el **síndrome de Down** (trisomía 21), el **síndrome de Patau** (trisomía 13), el **síndrome de Edwards** (trisomía 18), el síndrome de **Klinefelter** (47,XXY) y el **síndrome de Turner** (monosomía X) (Hassold & Hunt, 2001). Dentro de las poliploidías, la más común es la triploidía, presente en aproximadamente 1 de cada 10.000 recién nacidos vivos (Salomon, *et al.*, 2005). En general, se ha observado que la pérdida de material cromosómico tiene mayor repercusión clínica y es tolerado en menor grado que la ganancia de material genético (Torres, *et al.*, 2008).

La detección de los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas ha progresado junto con el advenimiento y la mejora de las técnicas citogenéticas y moleculares. El desarrollo de las técnicas de bandeo cromosómico en 1970, permitió la identificación y clasificación de cada cromosoma según los patrones de bandeo (Caspersson, *et al.*, 1970). A partir de dichos avances, se ha logrado un progreso significativo en la identificación de numerosas alteraciones cromosómicas.

El cariotipo es la técnica más comúnmente empleada en el diagnóstico de anomalías cromosómicas (Seabright, 1971). Se ha descrito que de los fetos con múltiples defectos estructurales detectados por ecografía, en un 18-35% de los casos se identifican anomalías cromosómicas por cariotipo convencional (Gonen, *et al.*, 1995; Rizzo *et al.*, 1990). Esta técnica tiene una resolución limitada de 450-500 bandas, ampliada a 1000 bandas con el cariotipo de alta resolución (Yunis, 1976). Esta limitación está parcialmente solventada por técnicas como FISH (Hibridación *in situ* fluorescente), MLPA (amplificación de sonda dependiente de ligación) y aCGH (hibridación genómica comparada), en aquellos pacientes con defectos congénitos que tiene anomalías cromosómicas submicroscópicas no detectables con las técnicas citogenéticas convencionales, pero identificables por estas otras técnicas (Ming *et al.*, 2006).

Actualmente, las estrategias de diagnóstico prenatal están basadas en el análisis citogenético (estudio por cariotipo convencional, FISH o MLPA) cuando se detectan en el feto defectos congénitos múltiples por ecografía, cuando existen antecedentes de pérdida fetal recurrente, cuando el resultado del triple marcador sérico está alterado, cuando la pareja presenta un hijo previo con cromosomopatía, cuando alguno de los progenitores presenta alguna anomalía cromosómica estructural o cuando la gestante es de edad avanzada (Simpson & Elias, 2003).

Una de las enfermedades que ha sido diagnosticada mayoritariamente, mediante el empleo de sondas FISH o MLPA es el síndrome de delección 22q11.2, donde se emplea sondas específicas para dicha región cromosómica (Edelmann, 1999a; Edelmann *et al.*, 1999b).

1.1.2.2.1.1 SÍNDROME DE DELECIÓN 22Q11.2

El síndrome de delección 22q11.2 (OMIM 188400/192430), también ha sido conocido como CATCH 22, epónimo que englobaba el síndrome de DiGeorge, velocardiofacial o de Shprintzen, la anomalía facioconotruncal y el síndrome cardiofacial de Cayler. La incidencia de este síndrome es de 1:4.000-1:6.000 recién nacidos y no se han observado diferencias según grupo étnico o género (Botto *et al.*, 2003)

El síndrome de DiGeorge, descrito en 1965 como defecto primario del 4º arco branquial y 3ª y 4ª bolsas faríngeas, incluía la implantación baja de orejas, *filtrum* corto, telecanto con fisuras palpebrales cortas, hipocalcemia por hipoplasia paratiroidea, defectos en el tracto de salida del corazón (principalmente tetralogía de Fallot) y déficit inmunológico, principalmente de células T, por hipoplasia del timo. El Síndrome Velocardiofacial, correspondía a anomalías cardíacas con una apariencia facial inusual, paladar hendido a menudo submucoso, baja talla, dedos largos, delgados e hiperextensibles y la *facies* se caracterizaba por una nariz prominente, bulbosa y alas nasales hipoplásicas, micrognatia, microcefalia y ocasionalmente, anomalías oculares (Cuneo, 2001). Los aspectos clínicos más característicos del síndrome de delección 22q11.2 son los siguientes:

- Cardiopatías congénitas: (presentes en el 74% de los casos,)
- Tetralogía de Fallot, atresia pulmonar con comunicación interventricular, coartación aórtica, o tronco común arterioso.
- Anomalías del paladar (en 70% de los pacientes)
- Incompetencia velofaríngea, paladar hendido y voz nasal
- Dificultades del lenguaje (70-90% de los afectados)
- Retraso mental (46% de los casos)

Además, presentan características faciales peculiares con alteraciones de la implantación y forma de los pabellones auriculares, orejas protuberantes y puntiagudas, nariz con puente aplanado. Asimismo, pueden padecer hipocalcemia por hipoparatiroidismo funcional y alteraciones inmunitarias que ocasionan infecciones de repetición, sobre todo en el área sinopulmonar.

También, se han descrito alteraciones psíquicas en la adolescencia o en la vida adulta en pacientes afectados de este síndrome (Bassett *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2005).

Esta enfermedad es un síndrome de genes contiguos, donde se ha descrito en la región cromosómica 22q11.2 una delección de 3 Mb, que la presentan entre el 80-90% de los pacientes y otra de 1.5 Mb detectada en el 8% de los pacientes y constan de 40 y 30 genes, respectivamente (*figura 1.7*). A pesar de ser la misma región cromosómica, existe una elevada heterogeneidad fenotípica (Edelmann, 1999a; Edelmann *et al.*, 1999b; Ryan *et al.*, 1997).

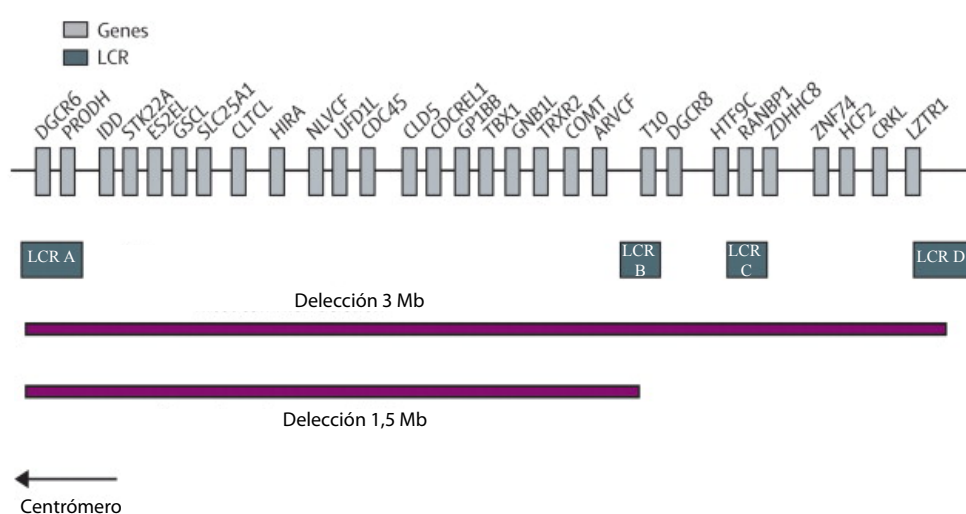


Figura 1.7. Locus 22q11.2: región de delección de 3 Mb y 1.5 Mb flanqueadas por secuencias LCR (low-copy-repeats) marcadas en verde. Estas secuencias predisponen a las recombinaciones no homólogas y a la delección de los genes localizados entre ellas. Imagen obtenida de: Kobrynski & Sullivan, 2007.

En 2005, se reportó que la haploinsuficiencia del gen *Tbx1* en ratones, ocasionaba un fenotipo muy similar al síndrome 22q11.2 en humanos (Baldini, 2005). Posteriormente, Zweier y colaboradores en 2007, publicaron que las mutaciones que producen cambio de aminoácido en el gen *TBX1* en humanos, podrían aumentar la actividad transcripcional de la proteína, incrementando la estabilización proteína-proteína o a la afinidad de unión al ADN. Estos mismos autores concluyeron que esta ganancia de función podría generar el mismo espectro fenotípico que el originado por la haploinsuficiencia debida a delecciones o mutaciones de pérdida de función y propusieron que tanto la haploinsuficiencia de un conjunto de genes (ocurrida en la mayoría de los casos) como las mutaciones en el gen *TBX1*, en pacientes con fenotipo del síndrome de delección 22q11, pudiera ser la razón responsable de las principales anomalías físicas que ocurren en este síndrome (Zweier, *et al.*, 2007).

El gen *TBX1*, presenta tres isoformas (Chieffo *et al.*, 1997) que difieren en el procesamiento del exón 9 de su gen codificante, siendo la isoforma 9C, la más común en humanos (Gong *et al.*, 2001). El gen *TBX1* es un miembro de la familia de genes muy conservados filogenéticamente, que están involucrados en la regulación de procesos del desarrollo embrionario y que comparten un dominio de unión a ADN, llamado T-box, crucial para la dimerización de la proteína TBX1 (Plageman & Yutzey, 2005). Según Chieffo y colaboradores, el gen *Tbx1* en los ratones se expresa durante la embriogénesis en los arcos y bolsas faríngeas, así como, en la vesícula óptica y la expresión de la proteína TBX1 en tejidos humanos y fetales es similar al ratón (Chieffo *et al.*, 1997).

1.1.2.2.2 ENFERMEDADES MONOGÉNICAS

Se han descrito un gran número de enfermedades monogénicas que en la actualidad, están registradas en la base de datos específica OMIM, existiendo más de 15000 tipos diferentes de enfermedades mendelianas.

Las enfermedades monogénicas se manifiestan debido a la alteración de la función y/o estructura de las proteínas, ocasionada por los fallos inducidos o espontáneos en la replicación y/o reparación del ADN en las regiones codificantes o en zonas reguladores de los genes. La enfermedad queda restringida al individuo cuando las mutaciones ocurren a nivel somático, pero se transmiten de forma vertical según las leyes de Mendel, cuando las mutaciones ocurren en la línea germinal. De esta manera, las enfermedades mendelianas heredables se clasifican en autosómica dominante, autosómica recesiva o ligado a los cromosomas sexuales.

Los avances en la biología molecular han permitido el estudio directo de las enfermedades hereditarias analizando directamente la secuencia del ADN y mediante los estudios indirectos, cribando las regiones polimórficas cercanas a los genes responsables de la enfermedad en cuestión.

1.1.2.2.2.1 ENFERMEDADES MONOGENICAS ASOCIADAS A ANOMALÍAS CARDIACAS

Las cardiopatías congénitas (CC), se consideran el tipo de malformaciones congénitas más frecuentes, cuya frecuencia se estima en torno al 0,5-1% de los recién nacidos vivos (Belmont, 1998; Feit, 1997). Estas anomalías se originan por alteraciones en el desarrollo cardíaco durante el periodo fetal, sin embargo, su etiología es desconocida en la mayoría de las ocasiones. No obstante, se asocia el 80-85% a herencia poligénica o multifactorial, alrededor del 2-3% a factores ambientales (Wilson, *et al.*, 1998), un 8% a anomalías cromosómicas detectables mediante técnicas de citogenética convencional, cuyo valor alcanza el 25% al incluir las microdeleciones detectadas por arrays CGH o por MLPA (Ferencz *et al.*, 1989) y aproximadamente a un 5-10% a herencia monogénica (Payne, *et al.*, 1995).

Con el advenimiento de las nuevas tecnologías moleculares se está ampliando el porcentaje de pacientes en los que puede determinarse la causa de la cardiopatía congénita, y los nuevos estudios van aportando cada vez, más casos clínicos con cardiopatías asociados a mutaciones en un solo gen o bien, asociadas a síndromes malformativos (*tabla 1.2*).

Herencia monogénica
Cardiopatías aisladas
Estenosis aórtica supravalvular
Cardiomiopatía hipertrófica
Cardiomiopatía dilatada
Trastornos de la lateralidad
Síndromes de QT largo
Síndromes polimalformativos
Holt-Oram
Síndrome de Alagille
Síndrome de Noonan
Síndrome de Marfan
Síndrome de Ellis van Creveld
Anomalías cromosómicas
Visibles con técnicas convencionales
Síndrome de Down
Síndrome de Turner, trisomía 18, trisomía 13, etc.
Síndrome de microdeleción
CATCH 22
Síndrome de Williams
Síndrome de Rubinstein-Taybi
Herencia mitocondrial
Cardiomiopatía mitocondrial

Tabla 1.2. Etiología de las cardiopatías congénitas. Imagen obtenida de AGarcía & Rodríguez, 2000.

1.1.2.2.1.1 SÍNDROME DE NOONAN

El síndrome de Noonan (OMIM 163950), es una enfermedad clínica y genéticamente heterogénea caracterizada por dismorfia facial, talla baja, piel redundante en cuello, implantación baja del pelo en la región occipital, deformidad esternal, y un amplio espectro de defectos cardíacos (fundamentalmente estenosis de la válvula pulmonar) (Noonan, 1968).

La incidencia de este síndrome se ha estimado entre 1:1.000 y 1:2.500 recién nacidos (Nora, *et al.*, 1973), lo que le convierte en el síndrome no cromosómico más frecuente involucrado en anomalías cardíacas, siendo éstas la principal fuente de morbi-mortalidad en los pacientes con síndrome de Noonan (Noonan, 1994).

El sistema de clasificación de Van del Burgt, que categoriza en rasgos clínicos mayores y menores (*tabla 1.3*), ha resultado ser de gran ayuda para el diagnóstico clínico de dicha enfermedad. Según esta clasificación, un individuo presenta este síndrome cuando presenta dismorfia facial y otro signo mayor, o bien dos menores. Igualmente lo presentará, si los rasgos faciales son sugestivos y a ellos se suman dos criterios mayores o tres signos menores (van der Burgt *et al.*, 1994).

RASGOS	MAYORES	MENORES
Faciales	Característica	Sugerente
Cardíacos	Estenosis pulmonar y/o electrocardiograma típico	Otras cardiopatías
Estatura	Menor del percentil 3	Menor del percentil 10
Tórax	<i>Pectum carinatum / excavatum</i>	Ancho
Historia familiar	Familiar de primer grado con síndrome de Noonan	Familiar de primer grado con rasgos sugestivos de Síndrome de Noonan
Otros	Déficit mental /criptorquidia/ displasia linfática: tres de estos rasgos en niños; dos en niñas	Presencia de uno de ellos

Tabla 1.3. Criterios de Van del Burgt para diagnosticar el síndrome de Noonan.

El síndrome de Noonan sucede mayoritariamente *de novo*, o siguiendo un patrón de herencia autosómica dominante, siendo predominantemente, por vía materna (Allanson, 1986; Jongmans *et al.*, 2005; Sharland, *et al.*, 1992; Tartaglia & Gelb, 2005). No obstante, también se han reportado algunos casos de herencia autosómica recesiva (van der Burgt & Brunner, 2000).

El mecanismo por el cual suceden las mutaciones *de novo*, ha suscitado interés durante años. Mediante los estudios genéticos epidemiológicos y estadísticos se estableció una correlación entre la edad avanzada del padre y varios síndromes de herencia autosómica dominante. De esta manera, se atribuyó este fenómeno a la mayor probabilidad de transmisión de la mutación puntuales, por la división de la espermatogonias que se dividen a lo largo de la vida reproductiva del individuo masculino, que crea un mayor linaje de células mutadas, en comparación con la probabilidad de generar mutaciones puntuales en la división de las oogonias (Penrose, 1955).

Clásicamente, el diagnóstico del síndrome de Noonan se realizaba exclusivamente con los hallazgos clínicos, hasta la identificación de mutaciones con cambio de aminoácido en el gen *PTPN11* (OMIM 176876) en el 31-60% de los individuos afectados (Zenker *et al.*, 2004). Según la base de datos del Instituto de Genética Médica de Cardiff, se han descrito más de 90 mutaciones en el gen *PTPN11*, mayoritariamente localizadas en los exones 3, 8 y 13 (Hung *et al.*, 2007).

Este gen está localizado en la región cromosómica 12q24.1, contiene 15 exones (*figura 1.8*) e interviene en la codificación de la proteína tirosin-fosfatasa SHP-2. SHP-2 contiene dos dominios SH2 (N-SH2 y C-SH2) en el extremo amino terminal y un dominio PTP en el extremo carboxilo terminal cuya conformación tridimensional (*figura 1.9*) conlleva a que el dominio N-SH2 bloquee el sitio catalítico del dominio PTP de tal manera que de forma basal la proteína se encuentra inactiva funcionalmente (Tartaglia, *et al.*, 2010).

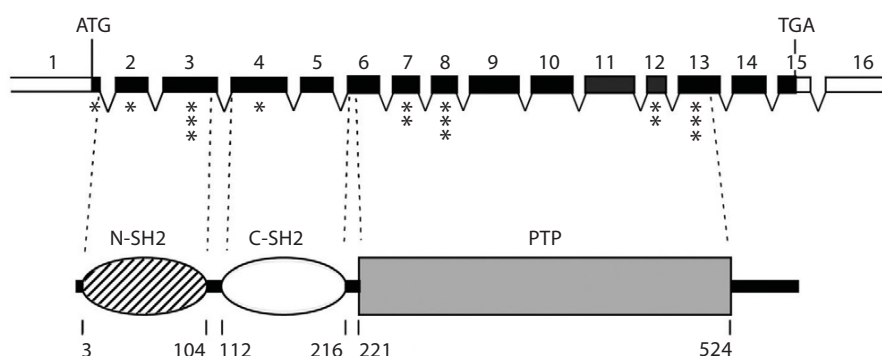


Figura 1.8. Representación esquemática del gen *PTPN11*, señalando los dominios proteicos de la proteína.

Imagen obtenida de Tartaglia, *et al.*, 2010.

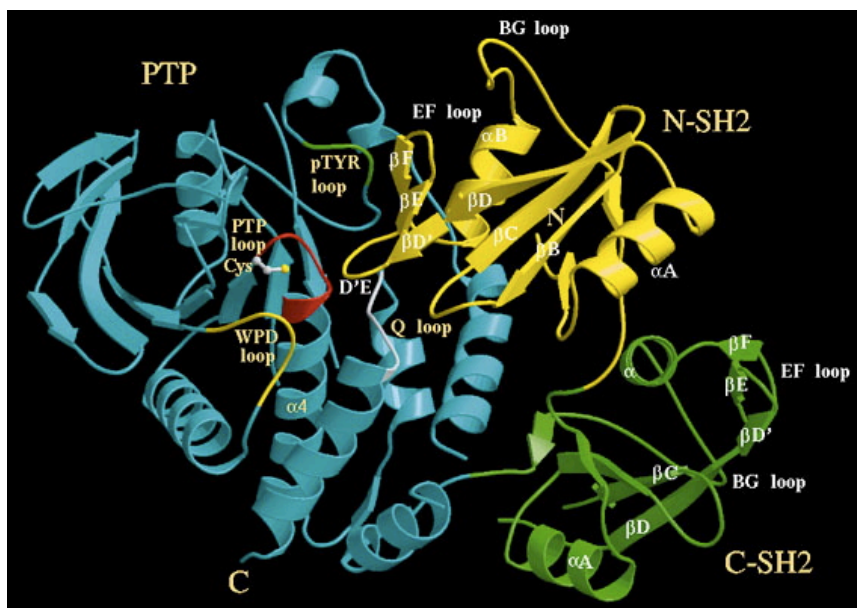


Figura 1.9. Ilustración de la estructura de la proteína SHP-2. Los dominios N-SH2, C-SH2, PTP se muestran en amarillo, verde y azul cian, respectivamente. Imagen obtenida de Barford & Neel, 1998.

Tras la fosforilación de los residuos ubicados en los dominios SH2, la conformación proteica cambia, de la forma inactiva a la activa tras liberarse el dominio PTP (Barford & Neel, 1998). La inmensa mayoría de las mutaciones registradas en el gen *PTPN11* se encuentran localizadas en el dominio NSH-2 o en el dominio PTP, originando un cambio conformacional de la proteína de forma inactiva a activa, manteniendo la forma activa permanentemente (Tartaglia *et al.*, 2002). La proteína SHP-2 se expresa ubicuamente y desempeña un papel importante en la transducción de señales de tirosin-quinasas y de receptores de factores de crecimiento mediante la activación de la cascada RAS/MAP quinasa (*figura 1.10*), que permite la proliferación, diferenciación y migración celular en función del contexto celular (Neel, *et al.*, 2003). Esta cascada es uno de los principales mediadores de los diferentes procesos del desarrollo, tales como: la determinación morfológica, la organogénesis, la plasticidad sináptica, y el crecimiento (Tartaglia *et al.*, 2010).

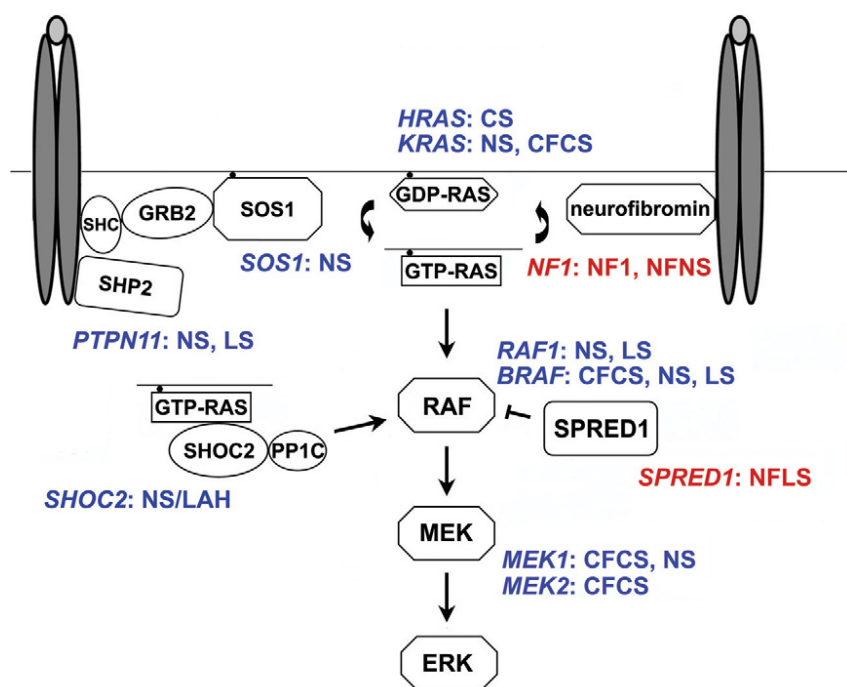


Figura 1.10. Diagrama esquemático de la ruta RAS-MAPK y los genes afectados en diferentes patologías relacionadas. Abreviaciones: CFCS: síndrome cardiofaciocutáneo; CS: síndrome de Costello; LS: síndrome LEOPARD; NSI: neurofibromatosis tipo I; NLS: síndrome Legius; NFNS: síndrome de Noonan neurofibromatoso; NS: síndrome de Noonan; NS/LAH: patología similar al síndrome de Noonan con pérdida de cuero cabelludo. Imagen obtenida de Tartaglia et al., 2010.

El análisis molecular del gen *PTPN11* puede ayudar al diagnóstico del síndrome de Noonan, cara al diagnóstico diferencial del síndrome de Costello (OMIM 218040) y el síndrome cardiofaciocutáneo (OMIM 115150). Sin embargo, a pesar de que el 50 % de los pacientes presentan mutaciones en el gen *PTPN11*, no es el único implicado en el síndrome de Noonan. Existen otros genes en la ruta de señalización RAS, también asociados a éste: *SOS1* (10-13 % de los casos), *RAF1* (3-17%), *KRAS* (<5%), *NRAS* (hasta la fecha 4 individuos detectados con mutaciones en este gen), *BRAF* (<2%), *MAP2K1* (<2%). (Stephens, et al., 2001)

1.1.2.2.1.2 SÍNDROME DE MARFAN

El síndrome de Marfan (OMIM 154700) fue descrito por primera vez en 1896, por el pediatra Bernard-Jean Antoine Marfan (Marfan AB, 1986). Se ha estimado la incidencia en 1 de 5000 a nivel mundial, sin diferenciación de género o etnia (Pyeritz, 2000), con aproximadamente el 27% de los casos esporádicos (Gray *et al.*, 1994). Se trata de una enfermedad multisistémica de herencia autosómica dominante, penetrancia completa y con expresión variable, que afecta a las fibras elásticas del tejido conectivo, donde principalmente, están alterados el sistema cardiovascular, el esquelético y el ocular. Entre los rasgos clínicos más destacados cabe mencionar unos miembros especialmente alargados, subluxación del cristalino y problemas cardíacos tales como aneurisma de aorta, dilatación de la raíz aórtica y prolapso de las válvulas mitral/ tricúspide.

Los criterios clínicos diagnósticos se establecieron, en Berlín en 1986 (Beighton *et al.*, 1988), que posteriormente, fueron sustituidos por la nosología de Gante en 1996 (De Paepe, *et al.*, 1996). Estos criterios proporcionaron unas guías clínicas con requisitos más estrictos para diferenciar el síndrome de Marfan de otras patologías con fenotipos semejantes.

Estos criterios han sido mundialmente utilizados por los profesionales, sin embargo, recientemente se han revisado, debido a: a) la necesidad de definir mejor ciertas categorías diagnósticas b) identificar individuos que podrían tener un diagnóstico alternativo y c) concretar las guías de manejo de niños, que aun no reuniendo criterios clínicos suficientes, pudieran manifestarlos en un futuro. En esta nueva revisión (*tablas 1.4 y 1.5*), se establecen como características cardinales el aneurisma o disección de la raíz de la aorta y la ectopia lentis, siendo la combinación de ambas suficiente para establecer el diagnóstico. En ausencia de cualquiera de las dos, se requiere la presencia de mutaciones en el gen *FBNI* o bien la combinación del resto de las manifestaciones regidas por una puntuación que ayuda al diagnóstico (Loeys *et al.*, 2010).

Órgano/Sistema	Requisitos para la clasificación de criterio mayor	Requisitos para la afectación de órgano/sistema
Esquelético	Al menos cuatro de los siguientes: 1. Pectus carinatum 2. Pectus excavatum que requiere cirugía 3. Ratio entre segmentos reducido o ratio envergadura y estatura elevado (<1,05) 4. Signos del pulgar y muñeca positivos 5. Escoliosis (20°) o espondilolistesis 6. Extensión del codo reducida (<170°) 7. Desplazamiento medial del maléolo interno causando pie plano 8. Protrusión acetabular	Al menos dos hallazgos para criterio mayor, o una de esa lista y dos de los siguientes criterios menores: 1. Pectus excavatum de moderada severidad 2. Hiperlaxitud articular 3. Paladar con arco pronunciado o aglomeración dental 4. Apariencia facial característica (dolicocefalia, hipoplasia malar, enoftalmos, retrognatia, fisura palpebral baja)
Ocular	Ectopia lentis	Al menos dos de los siguientes criterios menores: 1. Cornea anormalmente aplanada 2. Aumento de la longitud axial del globo ocular 3. Hipoplasia del iris o de músculo ciliar, provocando miosis reducida
Cardiovascular	Al menos uno de los siguientes: 1. Dilatación de la aorta ascendente con o sin regurgitación, afectando a los senos de Valsalva 2. Disección de la aorta ascendente	Al menos uno de los siguientes criterios menores: 1. Prolapso de la válvula mitral, con o sin regurgitación 2. Dilatación de la arteria pulmonar, en ausencia de estenosis u otra causa en individuos menores de 40 años 3. Calcificación del anillo mitral en menores de 40 años 4. Dilatación o disección de la aorta torácica descendente o abdominal en menores de 50 años
Pulmonar	Ninguno	Al menos uno de los siguientes criterios menores: 1. Neumotórax espontáneo 2. Bullas apicales
Tegumentos	Ninguno	Al menos uno de los siguientes criterios menores: 1. Estrías marcadas en ausencia de variaciones ponderales importantes, embarazo o estrés repetido 2. Hernia recurrente o incisional
Dura	Ectasia dural lumbosacra	Ninguna

Tabla 1.4. Requisitos para la clasificación de criterios clínicos según criterios clínicos de Gante revisados. En pacientes sin antecedentes familiares de síndrome de Marfan deben estar involucrados dos órganos/sistemas que reúnan criterios mayores y al menos la afectación de un tercer órgano/sistema. En pacientes con historia familiar solo se requiere un criterio mayor, con datos que sugieran afectación de un segundo sistema. Imagen Obtenida de Loeys et al., 2010.

<p>En ausencia de historia familiar de síndrome de Marfan</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ao ($Z \geq 2$) y EL = SMF^a 2. Ao ($Z \geq 2$) y mutación FBN1 = SMF 3. Ao ($Z \geq 2$) y score sistémico (≥ 7 puntos) = SMF^a 4. EL y FBN1 identificada en individuos con aneurisma aórtico = SMF <ul style="list-style-type: none"> • EL con o sin score sistémico, sin mutación en FBN1, o con mutación FBN1 no relacionada con aneurisma/disección aórtica = SEL • Ao ($Z \geq 2$) y score sistémico ($Z \geq 5$) sin EL = MASS • PVM y Ao ($Z < 2$) y score sistémico (< 5) sin EL = SPVM <p>En presencia de historia familiar (HF) de síndrome de Marfan</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. EL y HF de SMF = SMF 6. Score sistémico ≥ 7 puntos y HF de SMF = SMF^a 7. Ao ($Z \geq 2$ en mayores de 20 años, $Z \geq 3$ en menores de 20 años) e HF de SMF = SMF^a <p>Ao: diámetro aórtico en senos de Valsalva (indicado por Z-score) o disección; mutación FBN1: mutación en fibrilina 1; EL: ectopia lentis; MASS: fenotipo con miopía, prolapso mitral, dilatación limitrofe de raíz aórtica ($Z < 2$), estrías y hallazgos esqueléticos; PVM: prolapso de válvula mitral; SEL: síndrome de ectopia lentis; SMF: indica síndrome de Marfan; SPVM: síndrome de prolapso de válvula mitral; Z: Z-score.</p> <p>^a Advertencia: descartar síndrome de Shprintzen-Goldberg, síndrome de Loeys-Dietz o Ehlers-Danlos tipo vascular y tras estudio de mutaciones en TGFBR1/2, COL3A1 y bioquímica de colágeno.</p>	<p>Signo de la muñeca y el pulgar: 3 (signo de la muñeca o pulgar: 1) Pectus carinatum: 2 (pectus excavatum o asimetría pectoral: 1) Deformidad retropié: 2 (pie plano: 1) Neumotórax: 2 Ectasia dural: 2 Protrusión acetabular: 2 SS/SI reducida y ratio brazo/estatura incrementada y escoliosis no severa: 1 Escoliosis o cifosis toracolumbar: 1 Extensión reducida del codo: 1 Hallazgos faciales (3/5): 1 (dolicocefalia, enoftalmos, fisura palpebral baja, hipoplasia malar, retrognatia) Estría cutánea: 1 Miopía > 3 dioptrías: 1 Prolapso mitral (todos los tipos): 1</p> <p>Total máximo 20 puntos; un score ≥ 7 indica afectación sistémica. MS/MI: ratio segmento superior/inferior.</p>
---	--

Tabla 1.5. Criterios clínicos de Gante revisados (cuadro izquierdo) y los valores sistémicos (cuadro derecho) para el diagnóstico del Síndrome de Marfan. Obtenida de Loeys et al., 2010.

N-terminal
 C-terminal
 Segmento rico en Pro
 N-Glicosilación
 Péptido RGD
 dominio EGF
 dominio cbEGF
 dominio TB (8 cisteínas)
 dominio híbrido

Inicialmente, se consideró que la etiopatogenia de la enfermedad se debía al efecto dominante negativo de las mutaciones de la fibrilina 1, afectando a la multimerización de los distintos monómeros de la proteína para formar las microfibrillas. Este planteamiento se descartó con las investigaciones en modelos de ratón que sugirieron que se requería un umbral de reducción en la fibrilina 1, para poder manifestar los síntomas y que el aumento del factor de crecimiento TGF- β (*figura 1.12*), estaba relacionado directamente con la debilidad de la pared de la aorta y la aparición del aneurisma disecante (Neptune *et al.*, 2003).

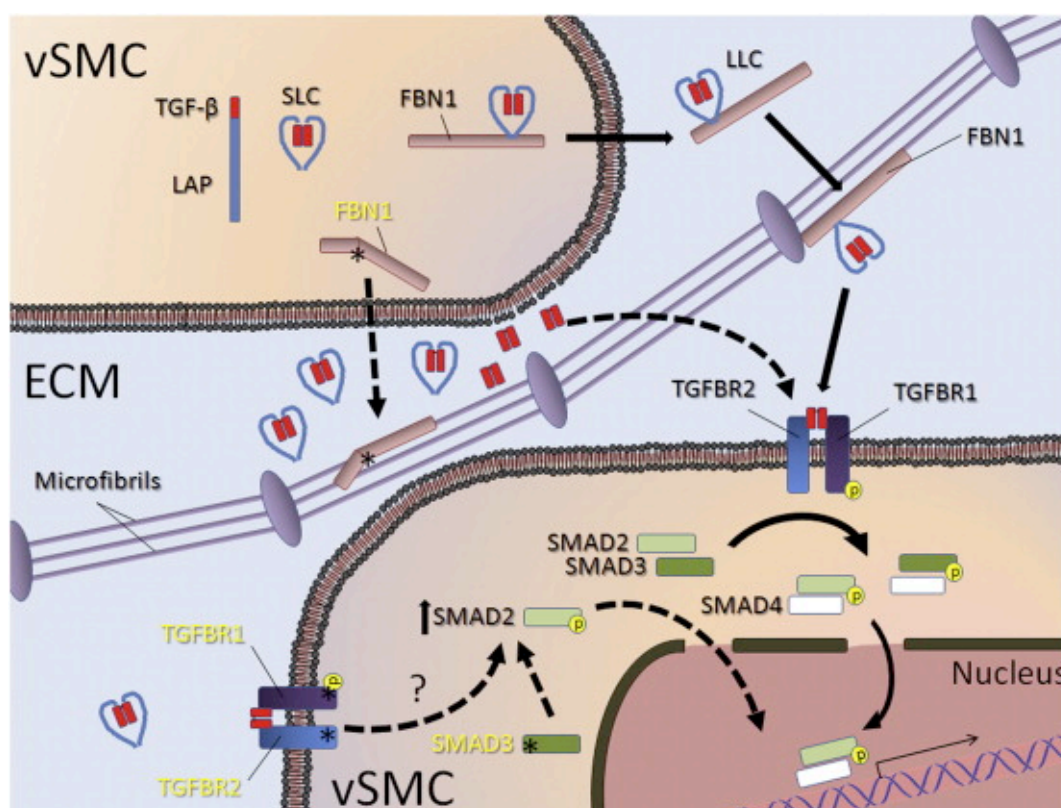


Figura 1.12. Ruta de regulación de TGF- β en una aorta madura. a) La actividad normal de TGF- β se representa mediante flechas continuas. TGF- β se genera en las células de músculo liso vascular (vSMC) y se une a LAP formando el complejo SLC que inactiva a TGF- β . SLC a su vez se une a FBN1 y forman el complejo LLC que es secretado a la matriz extracelular (ECM). FBN1 en el complejo LLC se une a las microfibrillas aislando el TGF- β inactivo. TGF- β se activa cuando es liberado del complejo LLC mediante proteasas como elastasas, MMPs, etc. El TGF- β activo se une a los receptores TGFBR1 y TGFBR2 causando la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 que al unirse ambas a SMAD4 se transfieren al núcleo activando la expresión de genes como MMPs, PAI-1, CTGF, MCP-1 entre otros. b) Las flechas discontinuas indican la ruta alterada de TGF- β y las proteínas que presentan una mutación se representan con un asterisco. La proteína FBN1 mutada no puede inactivar TGF- β , por lo que se incrementa la señal TGF- β . Mutaciones en TGFBR1 o R2 no propagarían la señal TGF- β pero paradójicamente se aumenta la señal de SMAD2 por mecanismos conocidos. Esto también ocurre cuando hay mutaciones en SMAD3. Fuente: Halushka, 2012.

Esto permitió el establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas, sustituyendo los tratamientos anteriores con propranolol u otros agentes bloqueadores β -adrenérgicos, que disminuían la presión arterial y por tanto, prevenían la dilatación aórtica, por el tratamiento con bloqueadores de los receptores de la angiotensina II incrementada su actividad debido al aumento de la actividad de TGF- β , que prevenía los efectos vasculares del Síndrome de Marfan.

Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la administración de Losartán, previene la aparición del aneurisma aórtico en ratones con síndrome de Marfan (Habashi *et al.*, 2006). Algunos pacientes muestran manifestaciones clínicas que se superponen con este síndrome como es el caso del síndrome de Loeys- Dietz ó al aneurisma aórtico familiar (FTAA) (*tabla 1.6*). Los genes responsables son: gen *TGFR1* localizado en 9q33-34 , compuesto de 9 exones y que explica el 5% de los casos del subtipo I (MFS1) y el gen *TGFR2* localizado en 3p22 , que consta de 7 exones y que explica del 5-10% de los casos tipo II (MFS2) (Loeys *et al.*, 2010).

	Condición que define la similitud con Marfan	Síntomas sistémicos superpuestos con Marfan	Gen afectado
<i>Fibrilopatías</i>			
Ectopia lentis familiar	Luxación del cristalino	Manifestaciones esqueléticas comunes	Mutación FBN1 en formas autosómico dominantes y en formas recesivas mutaciones en el LTBP2 y ADAMTSL4.
Fenotipo MASS	Dilatación aórtica borderline	Manifestaciones esqueléticas y cutáneas comunes	Autosómico dominante. A veces mutación FBN1
Prolapso de la válvula mitral sintomático	Prolapso de la válvula mitral	Manifestaciones esqueléticas variables	Esporádica o autosómica dominante. A veces mutación FBN1
Síndrome de Beals	Prolapso de la válvula mitral	Manifestaciones esqueléticas variables	Autosómico dominante mutación FBN-2
Síndrome de Shprintzen-Goldberg	Dilatación aórtica	Cutáneas y esqueléticas	Autosómico dominante. A veces mutación FBN1
<i>No fibrilopatías</i>			
Síndrome Loeys-Dietz	Dilatación aórtica y disección	Manifestaciones esqueléticas variables	Autosómico dominante. Mutación TGFR 1/2
Síndrome de Stickler	Miopía, desprendimiento de retina, prolapso de la válvula mitral	Hipermobilidad articular/contracturas. Escoliosis	Mutación en genes del colágeno.
Síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV	Dilatación aórtica y disección. Solo en tipos seleccionados	Prolapso de la válvula mitral	Autosómico dominante. Mutación COL3A1
Síndrome de tortuosidad arterial	Dilatación aórtica y disección		SLC2A10
<i>Otros</i>			
Habito marfanoide	Manifestaciones esqueléticas	Manifestaciones esqueléticas comunes	A veces se detecta FBN1
Homocistinuria	Luxación del cristalino	Cutáneas y esqueléticas	Sin afectación genética
Aneurisma aórtico familiar	Dilatación y disección aórtica	Manifestaciones esqueléticas variables	Locus genético TAAD1, TAAD2 (TGFR2), TAAD3, TAAD4 (ACTA2), TAAD5 (TGFR1), TAAD-ductus arterioso patente (MYH11) i FAA1
Válvula bicuspidé aórtica con dilatación aórtica	Dilatación y disección aórtica		Desconocidos

Tabla 1.6. Diagnóstico diferencial del síndrome de Marfan.

1.1.2.2.2 ENFERMEDADES MONOGÉNICAS ASOCIADAS A ANOMALÍAS ESQUELÉTICAS

Las alteraciones del desarrollo esquelético constituyen un grupo de afecciones que afectan al crecimiento, a la estructura o a la morfología del esqueleto. La clasificación de estas anomalías ha sido revisada en diversas ocasiones, desde su primera clasificación topográfica realizada por Rubin en 1964 (Rubin, 1964) que estaba basada en la agrupación de las alteraciones en epifisarias, fisarias, metafisarias y diafisarias, y subclasificación en hipoplásicas (por defecto), e hiperplásicas (por exceso).

Esta clasificación fue posteriormente completada y modificada, introduciendo los términos de:

- **Osteodisplasias:** alteración intrínseca en el desarrollo y modelación ósea.
- **Osteodistrofias:** deformidad de los huesos en el curso de su desarrollo y modelación por perturbaciones nutritivas extrínsecas al hueso.
- **Disostosis:** malformaciones esqueléticas, como consecuencia de alteraciones en la morfogénesis embrionaria de los distintos patrones mesenquimatosos o ectodérmicos de huesos en formación.

En 1968 Aegerter y Kirkpatrick propusieron la distribución de las alteraciones en función de la fisiopatología, según el tipo de célula cuya función conlleva a la alteración. En 1970 se propuso la “Nomenclatura Internacional de Enfermedades Constitucionales del Hueso”, la cual fue modificada en 1977. Esta clasificación divide las afecciones según la etiología en: osteocondrodisplasias (anomalías de crecimiento que afectan a la estructura del hueso o el cartílago), disostosis, metabólicas y afectaciones óseas secundarias a alteraciones graves de otros sistemas o debidas a anomalías cromosómicas.

En la última versión se ha dividido las anomalías esqueléticas en 40 grupos (*figura 1.13*) cuya clasificación se ha determinado en función de los criterios clínicos, radiológicos y moleculares (Warman *et al.*, 2011).

GRUPOS	
1. FGFR3 (acondroplasia)	21. Condro dysplasia punctata (CDP)
2. Colágeno tipo 2 y similares	22. Displasias osteoscleróticas neonatales
3. Colágeno tipo 11	23. Densidad ósea aumentada (sin modificación de la configuración ósea)
4. Trastornos de sulfatación	24. Densidad ósea aumentada con compromiso metafisiario y/o diafisiario
5. Perlecan	25. Osteogénesis imperfecta y densidad ósea disminuida
6. Agrecan	26. Mineralización defectuosa
7. Filamina y relacionados	27. Enf. de depósito lisosomal con compromiso esquelético (disostosis múltiple)
8. TPRV4	28. Osteolisis
9. Displasias con costillas cortas (con o sin polidactilia)	29. Desarrollo esquelético desorganizado
10. Displasias epifisiaria múltiple y pseudoacondroplasia	30. Síndromes con sobrecrecimiento y compromiso esquelético
11. Displasias metafisiarias	31. Osteoartropatías genéticas inflamatorias/similares a artritis reumatoide
12. Displasias espondilo metafisiarias (SMD)	32. Displasia cleidocraneal y defectos de osificación aislados
13. Displasias espondilo-epi-(meta-)fisiarias [SE(M)D]	33. Síndromes de craneosinostosis
14. Displasias espondilo displásicas severas	34. Disostosis con compromiso craneofacial predominante
15. Displasias acromélicas	35. Disostosis con compromiso vertebral y costal predominante
16. Displasia acromesomélica	36. Disostosis rotulianas
17. Displasias mesomélicas y rizo-mesomélicas	37. Braquidactilias (con o sin manifestaciones extra-esqueléticas)
18. Displasias con "huesos curvos" (bent bones)	38. Defectos de reducción-hipoplasia de extremidades
19. Displasias con "huesos delgados" (slender bones)	39. Polidactilia-Sindactilia-Trifalangismo
20. Displasias con luxaciones articulares múltiples	40. Defectos en la formación articular y sinostosis

Tabla 1.7. Nosología y clasificación de los trastornos esqueléticos de origen genético (Warman et al., 2011).

Hasta la fecha se han clasificado más de 450 anomalías esqueléticas, cuya incidencia es de 1/5000 nacidos vivos, aunque cada una de las diferentes anomalías, en sí mismas, son consideradas enfermedades raras (Orioli, et al., 1986).

De entre todas anomalías asociadas a síndromes, este trabajo se centra en las siguientes:

- Ellis Van Creveld (Grupo 9)
- Displasia acromesomélica tipo Grebe (Grupo 16)
- Displasia oculodentodigital (Grupo 24)
- Osteogénesis Imperfecta (Grupo 25)
- Síndrome de Holt-Oram (Grupo 38)

1.1.2.2.2.1 SÍNDROME DE ELLIS VAN CREVELD

El síndrome Ellis-van Creveld (EvC, OMIM 225500) es una displasia condroectodérmica de herencia autosómica recesiva de muy baja prevalencia, en el que se han reportado exclusivamente 300 casos en el mundo (Baujat & Le Merrer, 2006; Ruiz-Perez *et al.*, 2000), perteneciendo la mayoría a población Amish americana (con una incidencia de 5/1.000 nacidos vivos) (McKusick, 2000) y a población árabe (Emiratos árabes) cuya incidencia es 52/1.000.000 de nacidos vivos (Al-Gazali *et al.*, 2003).

Esta enfermedad fue descrita por Richard Ellis y Simon van Creveld en 1940 (Ellis & van Creveld, 1940) y se caracteriza por acortamiento distal y progresivo de las extremidades, displasia ungueal, polidactilia postaxial bilateral en las manos y ocasionalmente en los pies, defecto en la parte media del labio superior, hipoplasia de la dentina, oligodoncia y defectos cardíacos en el 60% de los casos afectados (da Silva, *et al.*, 1980; McKusick, *et al.*, 1964; Varela & Ramos, 1996). Estas anomalías son detectadas prenatalmente alrededor de la semana 18ª de gestación en la que se suele observar, un tórax estrecho, defectos cardíacos, un marcado acortamiento de los huesos largos y la polidactilia postaxial en miembros superiores e inferiores (Horigome, *et al.*, 1997; Venkat-Raman, *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, se han descrito al menos 45 mutaciones en el gen *EVC* y 51 mutaciones en *EVC2* (Ruiz-Perez & Goodship, 2009), ambos localizados en 4p16 (Polymeropoulos *et al.*, 1996) (*figura 1.13*). Tanto *EVC* como *EVC2* se han asociado por igual a este síndrome (Galdzicka *et al.*, 2002; Ruiz-Perez *et al.*, 2000; 2003) y ambos producen el mismo espectro fenotípico, resultando clínicamente indistinguibles entre sí (Ruiz-Perez *et al.*, 2003; Valencia *et al.*, 2009). Se han descrito mutaciones en heterocigosis en estos genes que también se han asociado a la disostosis acrofacial Weyers, sin embargo, la herencia en este caso es autosómica dominante [(Ruiz-Perez *et al.*, 2000; Valencia *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2006).

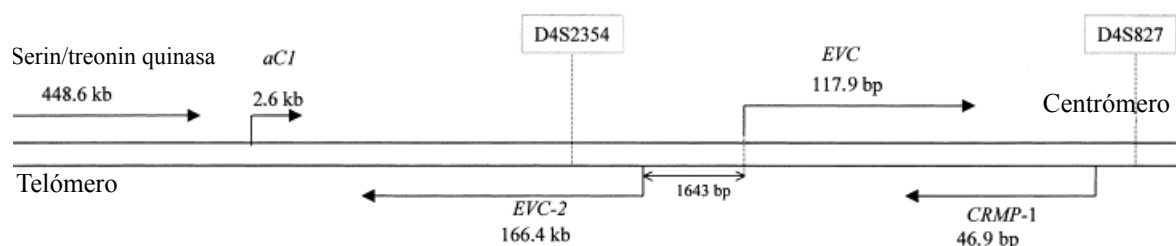


Figura 1.13. Representación esquemática de la orientación cromosómica y el tamaño de los genes *EVC* y *EVC-2*. Imagen obtenida de Galdzicka et al., 2002.

Bajo la hipótesis de que ambos genes debían intervenir en la misma ruta de regulación, ya que las mutaciones en ambos genes producen el mismo fenotipo, Blair y colaboradores en 2011 demostraron que, tanto *Evc* como *Evc2* son reguladores positivos e interactúan entre sí en la ruta de señalización HedgeHog (*figura 1.14*) y que *Evc* y *Evc2* se expresan en la base del cilio primario en fibroblasto, en líneas celulares derivadas de células renales y en cultivo de condrocitos.

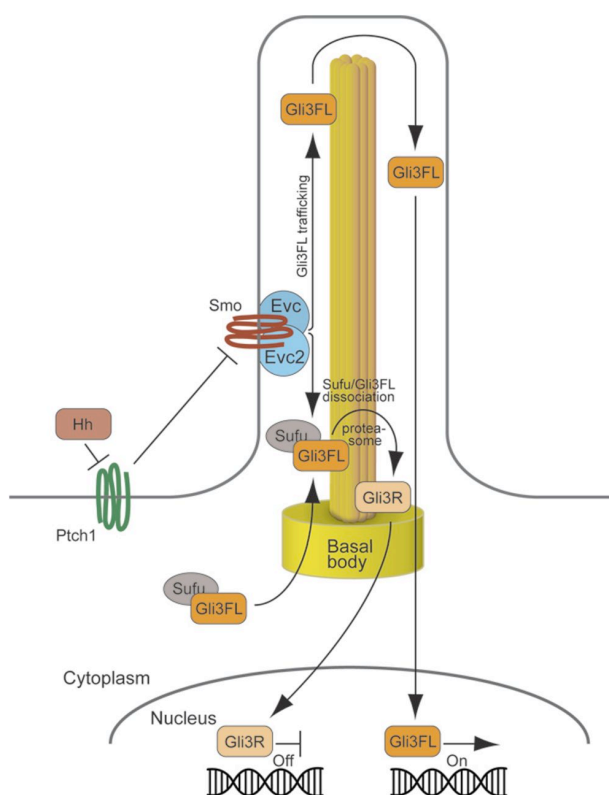


Figura 1.14. Representación esquemática del modelo de señalización *Evc/Evc2* propuesto en 2013. Imagen obtenida de Caparros-Martín et al., 2013.

Asimismo, tras el análisis de las secuencias nucleotídicas de EVC y EVC2, dedujeron que estos genes proceden de un gen ancestral, que se duplicó antes de la radiación de linajes de la mayoría de los metazoos y se encuentran enfrentados en su organización cromosómica, probablemente compartiendo un mismo promotor bidireccional, que realiza una regulación coordinada conjunta para mantener la apropiada estequiometría o posiblemente, porque ambos participan en la misma ruta de señalización (Blair *et al.*, 2011).

1.1.2.2.2.2 DISPLASIA ACROMESOMÉLICA TIPO GREBE

La displasia acromesomélica tipo Grebe (AMDG) (MIM: 200700) es una enfermedad autosómica recesiva, que se caracteriza clínicamente por enanismo severo con hipomelia y deformidad de las extremidades superiores e inferiores, con un gradiente de severidad próximo-distal con los dígitos reducidos a apéndices globulares sin articulación metacarpofalangeal aparente. En el análisis radiológico se observa acortamiento y deformación de los huesos largos medios, fusión de los huesos carpales y tarsales, así como la ausencia de falanges medias y proximales. Sin embargo, las características físicas faciales y la inteligencia de los individuos afectados por este síndrome son similares a la población general. En ocasiones, los portadores de la enfermedad presentan manifestación clínica, aunque de forma leve, en manos y pies como braquidactilia, polidactilia postaxial, retraso del crecimiento óseo y espondilolisis (Costa *et al.*, 1998).

Las mutaciones en el gen *CDMPI* han sido asociados a variedad de fenotipos entre ellos, se encuentra la displasia acromesomélica tipo Grebe, la displasia acromesomélica tipo Hunter-Thompson, al síndrome DuPan y a la braquidactilia tipo C. Según la base de datos HGMD, hasta la fecha, se han identificado 34 mutaciones, de las cuales 15 se asocian a Braquidactilia tipo C autosómica dominante, 4 al síndrome de DuPan, 4 al Condrodisplasia tipo Grebe, 3 al síndrome de sinostosis múltiple, entre otras patologías asociadas al gen como Braquidactilia tipo A1, Braquidactilia tipo A2 y Sinfalangismo (*figura 1.15*).

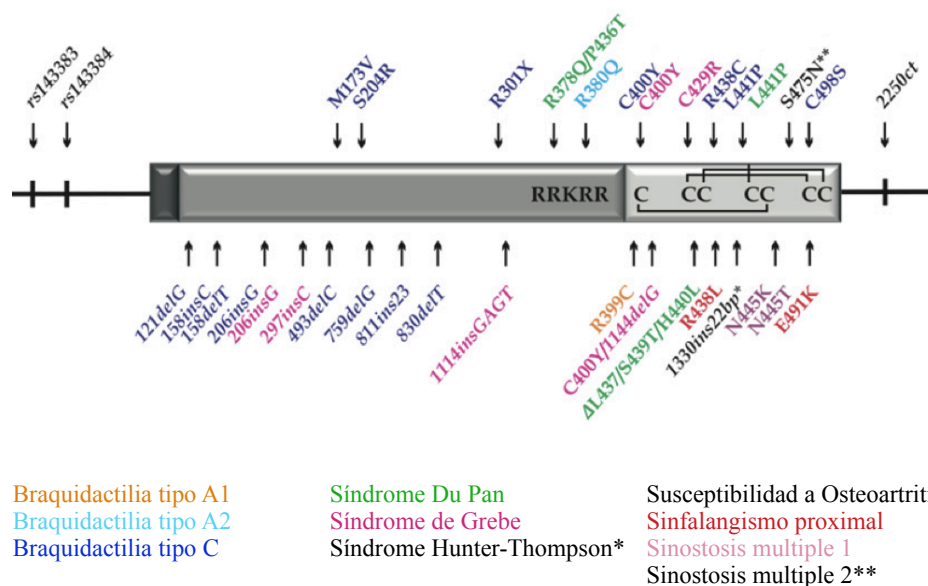


Figura 1.15. Localización de las mutaciones en la estructura monomérica de GDF-5. Las flechas indican algunas de las mutaciones d asociadas a malformaciones esqueléticas que afectan a los miembros. El monómero de la proteína GDF-5 consiste en un dominio amino-terminal (rectángulo negro), un homeodominio (rectángulo gris oscuro) y dominio C terminal (rectángulo gris claro). Esta imagen esta obtenida de Hellmann, et al., 2012.

Específicamente, en el caso de los individuos que presentan mutaciones en heterocigosis pueden presentar desde fenotipos leves como la braquidactilia tipo C, hasta no presentar sintomatología. En cambio, si los individuos presentan mutaciones en homocigosis y afectan al homeodominio pueden padecer anomalías de miembros más severas como las condrodisplasias acromesomelicas tipo Grebe o tipo Hunter-Thompson (Hellmann *et al.*, 2012).

El gen *CDMP1*, localizado en 20q11.22, se expresa preferentemente en zonas de diferenciación cartilaginosa de los huesos largos y de los elementos más distales del esqueleto apendicular en desarrollo (Jones, 2006; Thomas *et al.*, 1997) y codifica la proteína morfogenética derivada de cartílago (GDF-5), que es un miembro de la familia BMP y de la superfamilia de factores de crecimiento TGF- β (Chang *et al.*, 1994).

GDF5 es sintetizada a partir de un monómero de 501 aminoácidos que contiene tres dominios: un amino terminal, un homeodominio con una región de procesamiento proteolítica formada por 5 aminoácidos (RRKRR) localizada entre el codón 377 y 381 y reconocida por las endoproteasas y un dominio carboxilo terminal que contiene 7 residuos de cisteína. a partir de los cuales, dicho polipéptido puede formar homodímeros o heterodímero con proteínas de la familia BMP mediante puentes disulfuro, que activa la proteólisis produciendo una proteína madura que es secretada a nivel extracelular (Luyten, 1997). La proteína madura es un ligando de los receptores BMP (proteína morfogenética del hueso), que tras unirse a su receptor se produce una fosforilación cruzada del receptor de tipo I con el receptor de tipo II, que activan la propagación de la señalización celular de la ruta dependiente de SMAD y la ruta MAP quinasa p38 que ambas regulan la transcripción de genes relacionados con la formación ósea (Gilboa *et al.*, 2000).

La función de esta proteína madura consiste en el control del desarrollo y crecimiento esquelético (Chang *et al.*, 1994), mediante la estimulación del inicio de la condrogénesis: aumentando en primer lugar, la adhesión celular y después, regulando la proliferación condrocítica (Francis-West *et al.*, 1999).

1.1.2.2.2.3 DISPLASIA OCULODENTODIGITAL

La displasia oculodentodigital también denominada, displasia oculodentoósea o Síndrome de Meye-Schwickerath (OMIM 164200), se caracteriza principalmente, por manifestar anomalías oculofaciales, dentarias y digitales, tales como: microftalmia, microcórnea, puente nasal prominente, hipoplasia alar nasal (Sugar, *et al.*, 1966), microdontia, hipoplasia del esmalte dental, pérdida dentaria temprana (Fára *et al.*, 1976; Reisner *et al.*, 1969), sindactilia bilateral del 4º y 5º dedo de la mano y sindactilia del 3º y 4º dedo del pie (Reisner *et al.*, 1969). Esta patología presenta un patrón de herencia autosómico dominante (Gillespie, 1964), penetrancia completa y expresión variable tanto inter- como intrafamiliar (Judisch, *et al.*, 1979). Se han descrito un total de 250 casos, de raza blanca mayoritariamente, en todo el mundo (ORPHA2710).

La localización cromosómica de la displasia oculodentodigital en la región 6q.22-6q24 se realizó mediante análisis de ligamiento (Gladwin *et al.*, 1997), donde se refinó posteriormente la ubicación del gen *GJA1* (Paznekas *et al.*, 2003). Este gen consta de 2 exones, siendo el segundo exón el que codifica la proteína conexina 43 (Cx43), principal integrante de la subunidad alfa 1 de las uniones GAP (uniones en hendidura). Se expresa de una forma casi ubicua y presenta un efecto pleiotrópico, es decir, el mismo gen puede afectar a múltiples características fenotípicas (Paznekas *et al.*, 2003).

Se han descrito aproximadamente 37 mutaciones de las cuales, la mayoría son mutaciones que generan un cambio de aminoácido y la mayoría están localizadas en el extremo N-terminal (Paznekas *et al.*, 2003). Se ha propuesto que el mecanismo causal de esta patología puede ser debido a un efecto dominante negativo, en lugar de la haploinsuficiencia de la proteína, por la ausencia de delecciones y mutaciones de codón de parada en el gen. Además, se ha observado que el alelo silvestre no es capaz de compensar la falta de proteína activa y que el alelo no funcional provoca un efecto de inactivación sobre la conexina funcional restante (Söhl & Willecke, 2004).

La estructura básica de la conexina 43, al igual que el resto de las conexinas, presenta 4 dominios transmembrana, dos lazos extracelulares y un lazo intracelular. Los extremos N-terminal y C-terminal se ubican en la región citoplasmática (Laird, 2006; Saez, *et al.*, 2003; Mese & Richard, 2007). La estructura básica proteica está conservada entre las distintas conexinas (Cruciani & Mikalsen, 2002). La excepción de esta generalidad, la constituyen el dominio C-terminal y el lazo intracelular que presentan variaciones en la secuencia y por tanto, en esta estructura básica. Este hecho, conlleva a una mayor susceptibilidad a modificaciones post-traduccionales, las cuales, se piensa que pueden tener una función reguladora (Musil & Goodenough, 1993). La oligomerización de seis conexinas forman un conexón también llamado hemicanal, el cual se alinea en el espacio extracelular con el hemicanal de la célula adyacente, para establecer la unión GAP. Esta unión permite la comunicación intercelular (*figura 1.16*) que se basa en un intercambio de metabolitos, iones, mensajeros secundarios y moléculas de un tamaño inferior a 1KDa, que resulta fundamental para la fisiología del tejido así como, para el flujo de información necesario para el desarrollo embrionario adecuado (Richardson *et al.*, 2006).

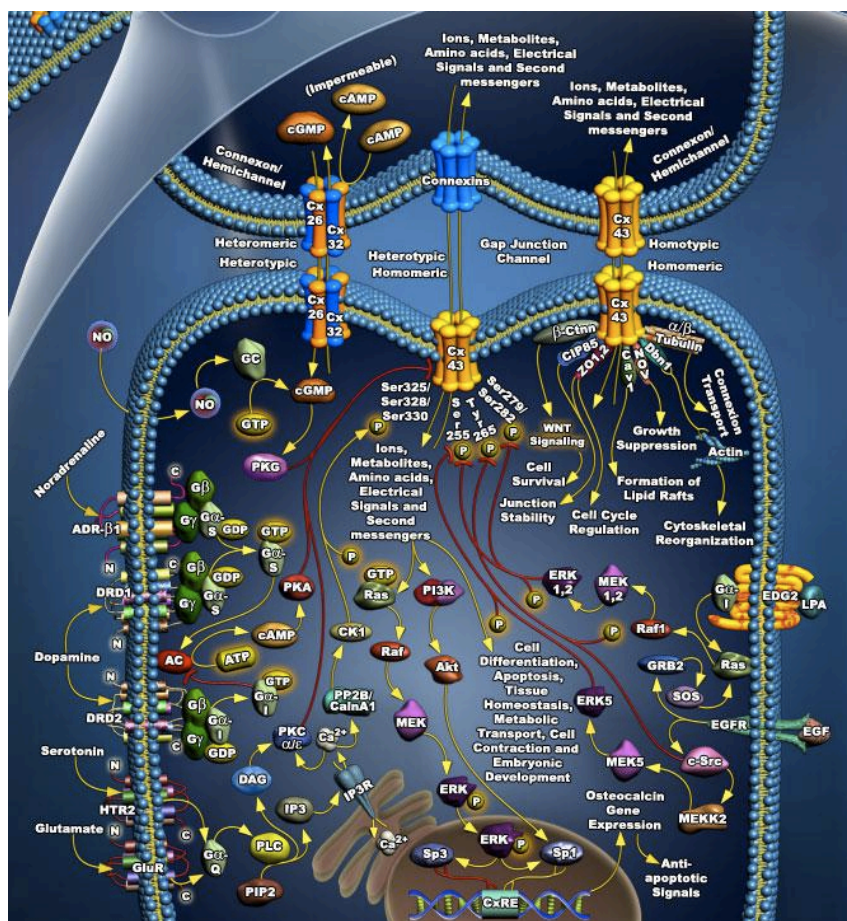


Figura 1.16. Comunicación intercelular mediante intercambio de metabolitos a través de las diferentes conexinas.

1.1.2.2.2.4 OSTEOGENESIS IMPERFECTA

La Osteogénesis Imperfecta (OI) es un trastorno del tejido conectivo caracterizado principalmente, por fragilidad ósea con gran susceptibilidad a las fracturas y baja masa ósea. Aunque se ha descrito que la incidencia global de la osteogénesis se encuentra entre 1/25.000 y 1/100.000, esta cifra varía en función del criterio clínico elegidos (Martin & Shapiro, 2007; Phillipi, *et al.*, 2008). El establecimiento de clasificaciones clínicas resultan de utilidad para la prognosis y el manejo de pacientes ya que se trata de una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico y genético.

En 1979, Silence y colaboradores (Sillence *et al.*, 1979) propusieron una clasificación inicial de la Osteogénesis Imperfecta, categorizando la enfermedad en 4 grupos según los hallazgos clínicos (*tabla 1.8*), teniendo en cuenta otros síntomas aparte de la fragilidad ósea tales como: baja estatura, esclera de color azul, escoliosis, deformidad progresiva de los huesos largos, pérdida auditiva y dentinogénesis imperfecta (Sillence *et al.*, 1979).

Tipo OI	Datos clínicos	Herencia	Defectos bioquímicos
I	Estatura normal, poca o ninguna deformidad: escleras azules, hipoacusia; rara vez, dentinogénesis imperfecta.	AD	Disminución de producción de procolágeno tipo I; sustitución de glicina por otro residuo en la triple hélice de alfa (I)
II	Letal en el período perinatal; ausencia mineralización bóveda craneana, rosario costal, fémures comprimidos, deformidades importantes de huesos tubulares, platispondilia.	AD (mutación de novo) AR (rara)	Redistribución de los genes COL1A1 y COL1A2; sustituciones por residuos glicina en el dominio triple-helicoidal de las cadenas alfa-1 (I) o alfa-2 (I); pequeñas delecciones en alfa-2 (I) en presencia de un alelo nulo.
III	Deformidad ósea progresiva, moderada al nacimiento; escleras variables a menudo se blanquean con la edad, estatura corta; rara vez hipoacusia dentinogénesis común.	AD AR	Mutación puntual en cadenas alfa-1 (I) o alfa-2 (I). Mutación por error en la lectura que previene la incorporación de proalfa-2 (I).
IV	Escleras normales; deformidad ósea moderada; estatura variable; dentinogénesis común; hipoacusia.	AD	Mutaciones puntuales en la cadena alfa-2 (I); raras en alfa-1 (I); pequeñas delecciones en la cadena alfa-2 (I).

Byers PH, Disorder of collagen structure and synthesis, 1995⁽¹⁾

Tabla 1.8. Clasificación de la Osteogénesis Imperfecta propuesta en 1979 (Sillence *et al.*, 1979).

Posteriormente, con los avances en las investigaciones en la genética humana y en las evaluaciones morfológicas y radiológicas, la Osteogénesis Imperfecta se clasificó en 8 grupos (Rauch & Glorieux, 2004). El espectro clínico de estos tipos varía desde formas leves (OI tipo I, IV y V), severas (OI tipo III, VI, VII y VIII), hasta formas letales en el período perinatal (OI tipo II, VII y VIII) (Basel & Steiner, 2009). La mayoría de las formas de la Osteogénesis Imperfecta se heredan de forma autosómica dominante, sin embargo, la herencia autosómica recesiva se ha descrito en algunos casos.

Las mutaciones en los genes *COL1A1* y *COL1A2* se han relacionado con la OI tipo I, II, III y IV (Basel & Steiner, 2009; Rauch & Glorieux, 2004), mutaciones en el gen *CRTAP* se ha asociado a OI tipo VII (Baldrige *et al.*, 2008; Morello *et al.*, 2006) y en el gen *LEPRE1* a OI tipo VIII (Baldrige *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2007). La base molecular de los tipos V y VI se desconoce aunque se han detectado mutaciones en los genes *PPIP*, *FKBP10* y *SERPINH1* en pacientes con formas severas de OI (Alanay *et al.*, 2010; Christiansen *et al.*, 2010; van Dijk *et al.*, 2009).

La mayoría de los individuos afectados de OI presentan mutaciones en el gen *COL1A1* (localizado en 7q22.1) o en el gen *COL1A2* (localizado en 17q21.3); éstos codifican respectivamente las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del colágeno tipo I, que representa un 90 % del colágeno total siendo responsable de un 70 a un 80 % del peso seco de los tejidos fibrosos densos que forman el sistema musculo-esquelético. En casi todas las formas de OI, aquellas mutaciones que reducen la cantidad de colágeno tipo 1 sintetizado están asociadas a las fenotipos leves y aquellas que producen anomalías en su estructura, están asociadas a los fenotipos moderados y letales. El colágeno tipo I es una proteína esencial de la piel, de los tendones, de los vasos sanguíneos de los huesos y de los dientes, puesto que proporciona la estructura e integridad mecánica del organismo (de Wet *et al.*, 1987).

El colágeno tipo I es una proteína formada por un heterotrímero constituido por dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ (Witecka *et al.*, 2008). Cada cadena contiene un dominio triple hélice de 1014 aminoácidos compuestos por repeticiones ininterrumpidas del tripéptido Gly-X-Y donde X e Y suelen ser prolina y lisina respectivamente y este dominio está flanqueado por propéptidos en los extremos amino y carboxiterminal formando el procolágeno (de Wet *et al.*, 1987) (*figura 1.17*).

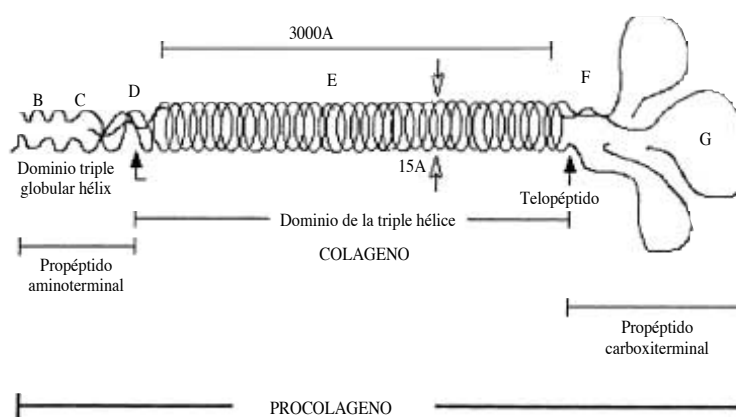


Figura 1.17. Modelo de estructura de las moléculas de colágeno y procolágeno.

Imagen modificada de Byers, *et al.*, 1982.

El ensamblaje de la triple hélice comienza con la asociación de los propéptidos del carboxilo terminal y posterior a la nucleación de la misma, se produce la propagación linear hacia el extremo amino terminal. La glicina es el aminoácido crucial para la formación de esta estructura, porque es el único residuo suficientemente pequeño y que cumple los requerimientos estéricos necesarios para colocarse en la parte interna de la hélice (Dalglish, 1997). Por ello, el 80% de las mutaciones que afectan a nivel cualitativo el colágeno tipo I son substituciones de glicina por otro aminoácido y el 20% restante afectan al procesamiento alternativo, sin diferencias en las manifestaciones clínicas entre ellas (Cabral, *et al.*, 2006).

1.1.2.2.2.5 SÍNDROME DE HOLT-ORAM

El síndrome de HOLT-ORAM (HOS) fue descrito por Holt y Oram en 1960 (Holt, 1960) y pertenece a una de las anomalías raras con una incidencia de aproximadamente, 1/100.000 nacidos vivos (Basson *et al.*, 1994). Esta patología cuya patrón de herencia es autosómica dominante, se caracteriza principalmente por defectos esqueléticos en la extremidad superior y anomalías cardiovasculares particularmente, relacionadas con la septación cardíaca, sin embargo, la expresividad de este síndrome es variable tanto interfamiliar como intrafamiliarmente.

Aproximadamente, el 85% de los individuos que manifiestan esta patología presentan mutaciones *de novo* en el gen *TBX5* (Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). Este gen, que se encuentra localizado en 12q24, consta de 9 exones (Bruneau *et al.*, 2001) y contiene una secuencia muy conservada, denominada dominio de unión a DNA T-Box. Además, en el extremo carboxi-terminal (C-terminal) se encuentra localizado un dominio de activación transcripcional adyacente a una señal de localización nuclear (Zaragoza *et al.*, 2004).

Dicho gen codifica una proteína perteneciente a la familia T-Box de 518 aminoácidos que actúa como factor de transcripción, que junto con NKX2.5 y GATA4 en proporciones adecuadas juegan sinérgicamente un papel crucial en el desarrollo de los miembros superiores, así como en la cardiogénesis (Bruneau, *et al.*, 2001) (*figura 1.18*).

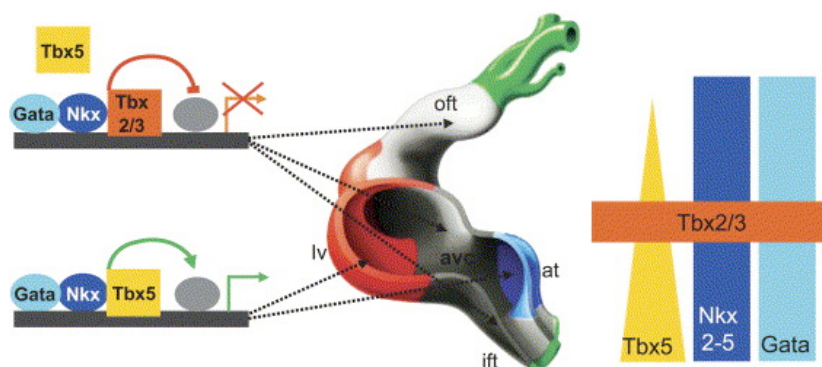


Figura 1.18. Modelo de regulación transcripcional cooperativa de los factores Nkx2.5, Tbx5 y Gata4 que activan la regulación de genes relacionados con las cámaras cardíacas. Tbx2 y Tbx3 compiten con Tbx5 por la unión a ADN y a Nkx2.5. Imagen obtenida de Dunwoodie, 2007.

Según la base de datos Human Genetics Medical Database, se han registrado más de 60 mutaciones en el gen *TBX5*, la mayoría de las cuales son mutaciones puntuales de cambio de aminoácido, que provocan variabilidad en la proteína expresada. Este hecho puede justificar la característica principal del síndrome de Holt-Oram, es decir, que distintos miembros afectados en la misma familia con la misma mutación manifiesten fenotipos diferentes, dificultando así, la correlación genotipo-fenotipo.

En 2003 se publicó un estudio, donde los autores concluyeron que la severidad de la manifestación fenotípica del síndrome no era predecible en base a las mutaciones identificadas en el gen *TBX5* (Brassington *et al.*, 2003). En un estudio llevado a cabo en ratones, se descubrió que el procesamiento alternativo de este gen ocasiona una isoforma larga (Tbx5a) y una corta (Tbx5b), las cuales presentan diferentes propiedades fisiológicas. Los autores proponen que en humanos, la desregulación de la dosis de estas dos isoformas podría ser la clave para establecer una correlación genotipo-fenotipo (Georges, *et al.*, 2008).

Los criterios clínicos estrictos del síndrome de Holt-Oram son:

- Deformidad del eje preaxial radial
- Defectos en la conducción cardíaca
- Defectos en el septo cardíaco atrial y/o ventricular.

Si cumplen los criterios entonces, la tasa de detección mutacional de dicho gen para el síndrome de Holt-Oram, alcanza el 75% de los casos. Sin embargo, la sensibilidad del test genético desciende al 25% cuando el diagnóstico clínico no se ajusta exclusivamente, a los criterios estrictos (McDermott *et al.*, 2005).

En España, uno de los primeros diagnósticos clínicos, fue llevado a cabo en el año 1967 por el Profesor Andrés Sánchez Cascos en la Fundación Jiménez Díaz en Madrid (Cascos, 1967), aunque el primer diagnóstico genético no fue reportado hasta 2006 (Fernández García-Moya *et al.*, 2006).

1.1.2.2.2.3 ENFERMEDADES MONOGÉNICAS ASOCIADAS A ANOMALÍAS OCULARES

La frecuencia de los defectos congénitos oculares es baja cuando se contabilizan individualmente, pero conjuntamente tienen un gran impacto en las diferentes especialidades de la medicina. Algunas anomalías son menores y no suponen costes o problemas, sin embargo, otras anomalías como el coloboma, microfalmia, anirida o la anomalía de Peters conllevan una significativa discapacidad visual. En un estudio epidemiológico llevado a cabo en España, se registró que de cada 10.000 recién nacidos 3.68 presentaban defectos oculares; siendo anoftalmia y microftalmia las anomalías más frecuentes seguidas de cataratas, opacidad corneal y glaucoma congénito. La mayoría de estos pacientes manifestaban los defectos oculares asociados a otras anomalías sistémicas, mientras que sólo el 21% de estos pacientes presentaban anomalías oculares aisladas (Bermejo & Martínez-Frías, 1998).

Los defectos congénitos oculares se pueden clasificar en función del segmento alterado, según la estructura ocular afectada, según la movilidad, según el gen afectado y pueden ser anomalías aisladas o asociadas a síndrome.

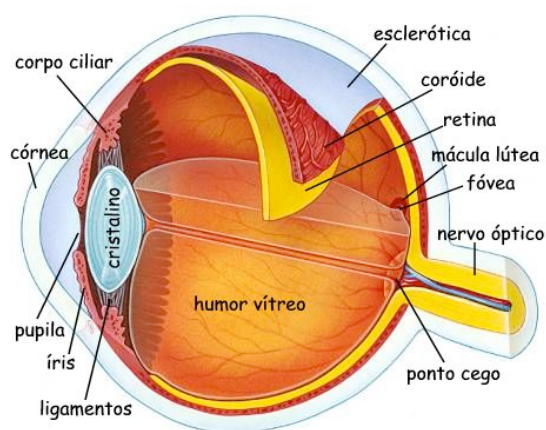


Figura 1.19. Anatomía del globo ocular humano.

En el interior del globo ocular, el cristalino y el cuerpo ciliar dividen al ojo en el segmento anterior y posterior. Asimismo, el segmento anterior se subdivide en cámara anterior y posterior (Romer, 1932) (*figura 1.19*):

1. Cámara anterior, limitada por la cara posterior de la córnea por delante y el diafragma iridopupilar por detrás. Está ocupada por humor acuoso.
2. Cámara posterior, entre el iris y pupila por delante y la cara anterior del cristalino, con sus fibras zonulares por detrás.
3. Cámara vítrea, limitada por la cara posterior del cristalino, fibras posteriores de zónula y parte del cuerpo ciliar por delante y el resto por retina. Su eje anteroposterior atraviesa una serie de estructuras transparentes cuya función es la de enfocar nítidamente, las imágenes sobre la retina.

Los ojos surgen a partir de la 4ª semana de gestación y se desarrollan a partir de cuatro orígenes embrionarios diferentes: neuroectodérmico del cerebro anterior, ectodérmico superficial de la cabeza, mesodermo situado entre ambas capas y las células de la cresta neural (Sadler & Langman, 2007).

En el desarrollo embrionario de estructuras anatómicas tan complejas como las oculares, intervienen diversos genes que, a su vez, interactúan entre sí, lo que dificulta la clasificación de las anomalías oculares. Esta misma complejidad los puede hacer susceptibles a la acción de múltiples agentes externos, que podrían interrumpir la correcta formación de sus intrincadas estructuras.

Este trabajo se ha centrado en el estudio del Albinismo como patología con afectación del globo ocular y por otro lado el Síndrome de Axenfeld Rieger como alteración del segmento anterior.

1.1.2.2.2.3.1 ALBINISMO

El albinismo es una condición genética heterogénea con una prevalencia global de todas las formas de albinismo alrededor de 1 en 17.000 (Witkop, 1979). Se caracteriza globalmente por la hipopigmentación total o parcial de la piel pelo y/u ojos y está causada por la deficiencia en la biosíntesis y/o transporte intracelular de la melanina (King, *et al.*, 1995).

La melanina es un biopolímero de estructura química compleja que se sintetiza a partir de tirosina y de la oxidación de los productos derivados (*figura 1.20.*). La tirosinasa cataliza los primeros pasos de la ruta metabólica mediante la hidroxilación de L-Tirosina a L-dopaquinona. Esta última puede transformarse espontáneamente en L-Ciclodopa, que a su vez se transformará en L-DOPA, subproducto que es de nuevo oxidado por la tirosinasa en L-Dopaquinona. En ausencia de compuestos tioles, la L-Dopaquinona se transforma en L-dopacromo. A partir de este punto, dos vías distintas conducen a la formación de los dos tipos de melanina: eumelanina (pigmentos marrones y negros) en la que intervienen diferentes proteínas como TYRP1 y TYRP2 (Olivares, et al, 2001) y feomelanina (pigmento rojizo-amarillento) que se forma en presencia de sulfhidrilos y la ulterior catalización de los intermediarios mediante peroxidada (Ito & Wakamatsu, 2008).

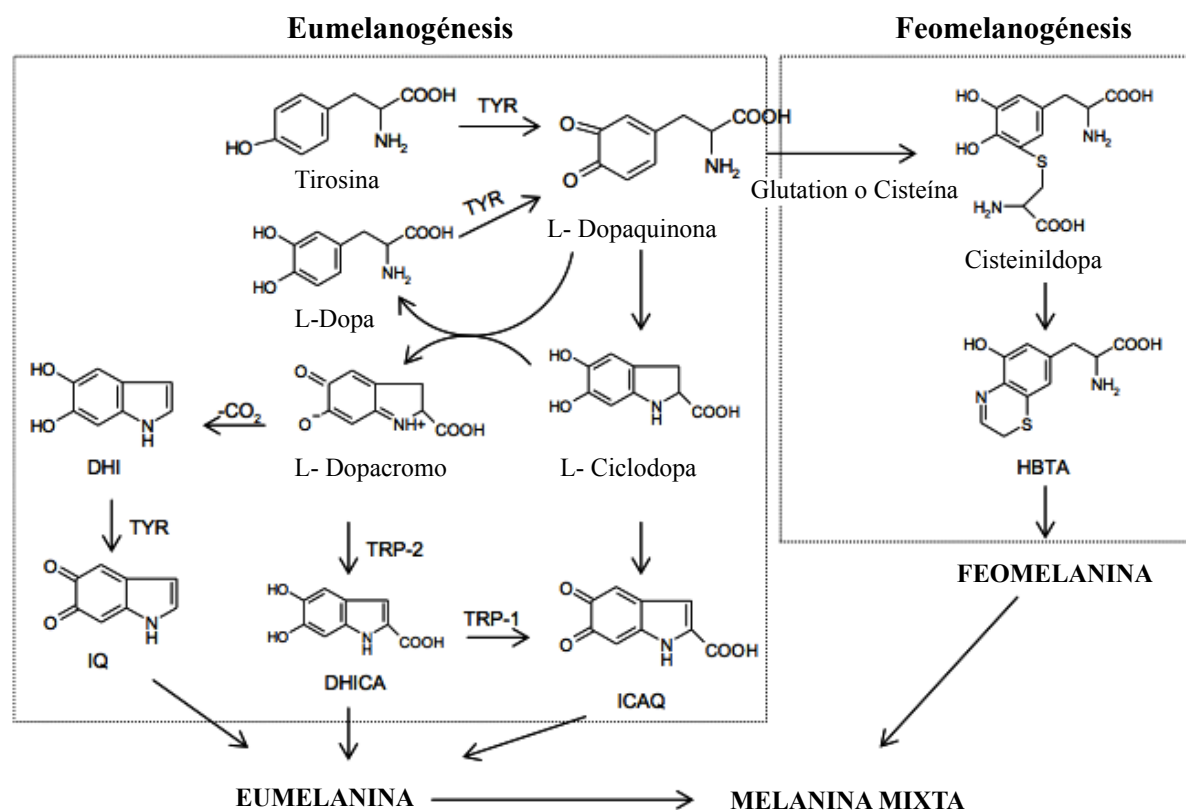


Figura 1.20. Biosíntesis de melanina. Imagen modificada de: (T.-S. Chang, 2009; Olivares et al., 2001)

El predominio de uno u otro tipo de melanina depende principalmente, del receptor de la melanocortina MCR1 de los melanocitos. Sus agonistas son la melanocortina llamada α -MSH u hormona estimulante de los melanocitos y la ACTH, que estimulan la proliferación y la melanogénesis en los melanocitos hacia la formación de eumelanina. Su antagonista es una proteína denominada Agouti que al unirse a MCR1, desvía la síntesis de melanina hacia la formación de feomelanina (Scott, et al., 2002).

La melanina se sintetiza en el interior de orgánulos subcelulares denominados melanosomas que se encuentran en dos tipos celulares de diferente origen embriológico (**figura 1.21**): los melanocitos y en el epitelio pigmentado de la retina (RPE) (King et al., 1995). Los melanocitos se desarrollan a partir de la cresta neural y se encuentran en: a) la capa basal de la epidermis donde realizan su principal función de fotoprotección y camuflaje b) en la leptomeninge y c) en el oído interno. En cambio el RPE provienen de la copa óptica generada desde el neuroectodermo y provee de base estructural y funcional a los fotorreceptores jugando un papel importante en el desarrollo de la retina.

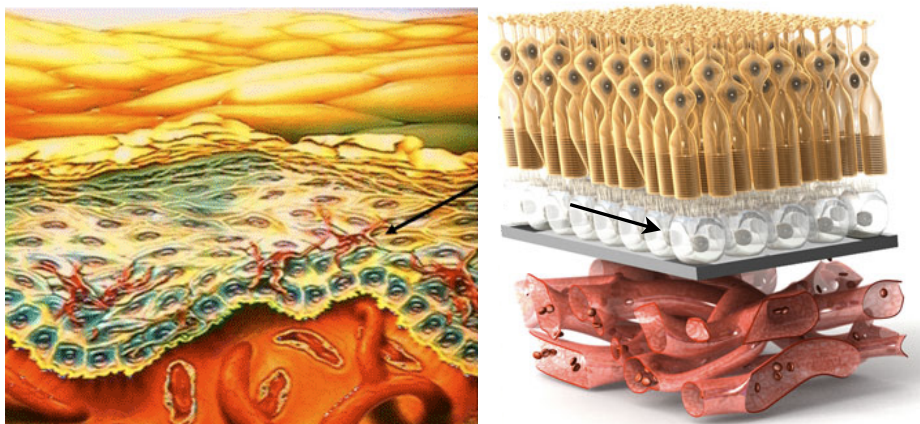


Figura 1.21. Melanocitos de la piel (imagen izq.) y Epitelio pigmentado de la retina (imagen de la dcha.).

Los melanosomas son originados a partir de precursores endosomales, sometidos a varias fases de maduración. Para ello intervienen un montón de proteína tales como (Schiaffino, 2010):

- TYR, TYRP1 y TYRP2 (DCT) importante para la maduración de los melanosomas.
- PMEL17 es una proteína estructural que es el principal componente del orgánulo.
- P, MATP/SLC45A2, SLC24A5 Transportadores de membrana que controlan la osmoralidad, la concentración de calcio y el control del pH respectivamente.
- GPR143 es un receptor acoplado a proteína G cuya función puede estar relacionado con el tamaño y número de melanosomas. (Schiaffino *et al.*, 1996).

Los melanosomas maduros se mueven por microtúbulos a la región perinuclear donde se acumulan, hasta que los filamentos de actina dispersan los orgánulos a la periferia celular, donde los melanocitos de la piel además son transferidos por procesos dendríticos a los queratinocitos vecinos (Schiaffino, 2010).

La melanina se acumula en el RPE en estadios tempranos del desarrollo y las alteraciones tanto en la síntesis de pigmento como en su transporte conllevan a alteraciones visuales, como nistagmo estrabismo, reducción de la agudeza visual, alteración de la percepción tridimensional y disminución de la visión nocturna (Creel, *et al*, 1997) como consecuencia de:

✓ Anomalías de las proyecciones axonales de las células ganglionares de la retina lo que provoca una pérdida de profundidad del cambio visual y por ende, la alteración de la percepción tridimensional (*figura 1.22.*). La base de la visión estereoscópica consiste en que los axones de las células ganglionares de la zona nasal de la retina decusan en el quiasma óptico al núcleo geniculado lateral, localizado en el hemisferio cerebral del lado opuesto, mientras que las células ganglionares de la zona temporal se proyectan ipsilateralmente. En los individuos con albinismo, la mayoría de las conexiones que les corresponderían la migración ipsilateral se proyectan contralateralmente (Jeffery *et al.*, 1997).

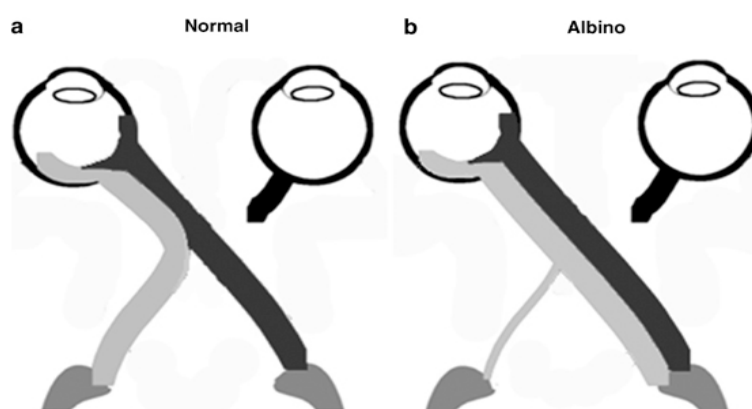


Figura 1.22. Proyecciones axonales de las células ganglionares de la retina en: a) un individuo normal y b) en un individuo con albinismo.

✓ Déficit del 30% del número total de fotorreceptores bastones dando como resultado una disminución de la visión en condiciones de baja luminosidad (visión nocturna y en penumbra).

✓ Subdesarrollo de la zona central de la retina. La hipoplasia foveal conlleva una pérdida de agudeza visual, ya que la fovea es la región central engrosada de la retina y especializada, donde hay una mayor concentración de conos, que son los fotorreceptores responsables de la visión cromática y de la alta resolución visual (*figura 1.23.*).

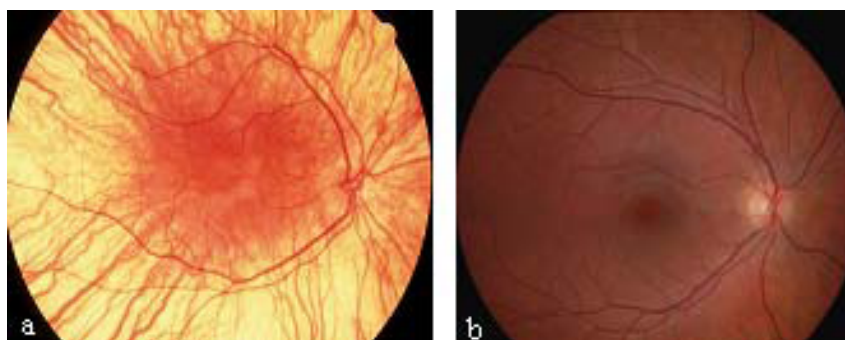


Figura 1.23. Fundoscopia del ojo derecho en: a) individuo con albinismo b) individuo normal. Imagen obtenida de Gronskov & Ek, 2007.

Estos defectos visuales son comunes en los diferentes tipos de albinismo, que se clasifican en diferentes tipos. Genéticamente se han asociado a albinismo al menos 15 genes y más de 600 mutaciones han sido descritas hasta la fecha (*tabla 1.9*).

Tipo de Albinismo	Acrónimo	Genes	Locus	Mutaciones en HGMD
Albinismo Oculocutáneo				
<i>Albinismo Oculocutáneo tipo 1A</i> <i>Albinismo Oculocutáneo tipo 1B</i>	OCA1A OCA1B	TYR	11q14.3	303
<i>Albinismo Oculocutáneo tipo 2</i>	OCA2	OCA2	15q12	152
<i>Albinismo Oculocutáneo tipo 3</i>	OCA3	TYRP1	9p23	16
<i>Albinismo Oculocutáneo tipo 4</i>	OCA4	SLC45A2	5p13.3	77
Albinismo Oculocutáneo Síndromico				
<i>Chediak-Higashi</i>	CHS1	LYST	1q43	50
<i>Hermansky-Pudlak tipo 1</i>	HPS1	HPS1	10q23.1-q23.3	31
<i>Hermansky-Pudlak tipo 2</i>	HPS2	AP3B1	5q14.1	11
<i>Hermansky-Pudlak tipo 3</i>	HPS3	HPS3	3q24	7
<i>Hermansky-Pudlak tipo 4</i>	HPS4	HPS4	22cen-q12.3	13
<i>Hermansky-Pudlak tipo 5</i>	HPS5	HPS5	11p14	11
<i>Hermansky-Pudlak tipo 6</i>	HPS6	HPS6	10q24.32	9
<i>Hermansky-Pudlak tipo 7</i>	HPS7	DTNBP1	6p22.3	2
<i>Hermansky-Pudlak tipo 8</i>	HPS8	BLOC1S3	19q13.32	2
<i>Hermansky-Pudlak tipo 9</i>	HPS9	PLDN	15q21.1	1
Albinismo Ocular Ligado al Cromosoma X				
<i>Albinismo Ocular tipo 1</i>	OA1	GPR143	Xp22.3	114

Tabla 1.9. Tipos de albinismo, genes asociados a cada subtipo clínico y número de mutaciones descritas en cada gen en la base de datos HGMD.

Clínicamente, el albinismo se clasifica principalmente en dos tipos:

1. Albinismo Ocular (OA): los defectos en la síntesis de pigmento afecta exclusivamente al sistema visual.
2. Albinismo oculocutáneo (OCA) si además del sistema visual se encuentra afectado el pigmento del piel y el pelo. Este último a su vez se puede subdividir en dos subtipos:
 - a) Albinismo oculocutáneo aislado.
 - b) Albinismo oculocutáneo sindrómico: se suman alteraciones en otros sistemas relacionados con los lisosomas (CHS acrónimo de Chediak-Higashi y HPS: acrónimo de Hermansky-Pudlak).

En este trabajo se han estudiados pacientes con centrado en el estudio del albinismo oculocutáneo aislado y el albinismo ocular ligado al X.

1.1.2.2.2.3.1.1 ALBINISMO OCULOCUTÁNEO AISLADO

El albinismo oculacutáneo aislado, cuya herencia es autosómica recesiva, es la forma del albinismo que presenta hipopigmentación en ojos piel y pelo. Aunque la prevalencia global se ha estimado en torno a 1:17.000, ésta varía según el tipo de albinismo y el grupo étnico. En este grupo caben distinguir 4 tipos en función de la clínica y los genes implicados.

El fenotipo **OCA1** es la forma más severa de albinismo y la más frecuente en la población europea. Está causado por la ausencia total (subtipo OCA1A) o reducción de la actividad de la enzima tirosinasa (subtipo OCA1B).

-El subtipo OCA1A es la forma más grave y los individuos que manifiestan este fenotipo, al no presentar actividad tirosinasa, no sintetizan ni pigmento ni los intermediarios metabólicos. Por lo tanto, cursan con una completa translucencia iridiana, piel pálida que no se tonifica con la exposición solar, y color de pestañas y cejas es blanco. El iris puede ser rosado, violeta, azul pálido o azul-grisáceo que no cambian con el tiempo (King & Summers, 1988).

-En cambio los pacientes con fenotipo OCA1B presentan actividad residual de la enzima tirosinasa, por lo que, la piel puede desarrollar cierto grado de pigmentación y como consecuencia de ello, el color de pelo puede progresar con la edad, desde rubio claro hasta tonalidades de castaño claro. El color de las cejas es similar al cuero cabelludo, pero las pestañas pueden ser algo más oscuras. La piel, aunque se mantiene con el tiempo pálida, puede adquirir tonalidad con el paso del tiempo y durante la exposición solar. Además, el iris azul puede cambiar a verde o marrón con la edad (King & Summers, 1988).

Estos fenotipos están causados por mutaciones en el gen *TYR*, que se encuentra localizado en la región cromosómica 11q14.2 y está constituido por 5 exones. Este gen codifica la enzima tirosinasa que es clave en la ruta de síntesis de la melanina y consiste en 529 aminoácidos y dos isoformas siendo la isoforma 1 la más caracterizada. La enzima consta de: un péptido señal, un dominio de crecimiento epidérmico similar, dos dominios de unión a cobre que forman la región catalítica de la proteína y un dominio transmembrana que forma una glicoproteína anclada a la membrana del melanosoma (Ray, *et al.*, 2007) (*figura 1.24*). El 90% de la proteína está situada en el interior del melanosoma, desde el amino terminal hasta el dominio transmembrana y el resto se encuentra en el citoplasma celular (Ray *et al.*, 2007).

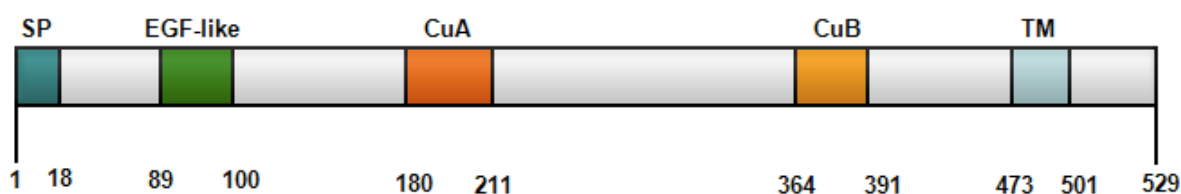


Figura 1.24. Representación esquemática de la estructura polipeptídica y los dominios proteicos de la enzima tirosinasa.

En general, las mutaciones más frecuentes en individuos caucásicos de Europa del Norte europeos es la mutación p. T373K que representa el 14% de los pacientes con OCA1, seguido de la mutación p.P81L, V275F, G446S, y IVS2-7T>A que representan el 41% del total de alelos mutantes identificados en pacientes caucásicos hispanicos no latinos (Hutton & Spritz, 2008). La mayoría de las mutaciones de cambio de aminoácido descritas hasta la fecha, se encuentran localizadas en los 5 dominios de la proteína

El fenotipo **OCA2** es la forma más frecuente en población africana de Albinismo Oculocutáneo en población africana y la segunda más frecuente en Europa. Su fenotipo varía desde características fenotípicas indistinguibles de OCA1B, hasta individuos con iris marrones oscuros. Aunque hay cierta acumulación de pigmento en el pelo durante los años, la variación no es tan acusada como en los individuos con fenotipo OCA1B. Normalmente presentan el mismo color de pelo y no varía a lo largo de la edad. Las mutaciones en el gen *OCA2* se asocian a este tipo de albinismo (Rinchik *et al.*, 1993), en concreto la delección de 2,7 kb es la mutación más frecuente en población africana que corresponde al 67% de los alelos mutantes del gen *OCA2* (Durham-Pierre *et al.*, 1994).

El fenotipo **OCA3**, también llamado albinismo tipo *Rufous*, está asociado a mutaciones en el gen *TYRP1* (proteína relaciona con tirosinasa) que se encuentra localizado en 9p23 (Boissy *et al.*, 1996). Este tipo de albinismo es poco frecuente en europeos, al igual que el **OCA4** causado por mutaciones en el gen *MATP* localizado en 5p13.3 (Newton *et al.*, 2001) y es frecuente en población japonesa (Inagaki *et al.*, 2004).

A continuación, se muestran las manifestaciones clínicas de los diferentes tipos de albinismo oculocutáneo aislado (*tabla 1.10*) y los genes asociados a cada uno de ellos junto con la prevalencia de cada subtipo clínico (*tabla 1.11*).

Tipo	Ojos	Piel	Cabello , Pestañas y cejas	Posible AV
OCA1A	Iris azul claro a casi rosado, completamente translúcido	Blanca, no se broncea. Nevus amelanóticos	Blancos	20/200
OCA1B	Iris azules pueden cambiar a verde o café	Blanca ,pueden desarrollar algún pigmento	Blancos, pueden desarrollar algún pigmento	20/100
OCA2	Color del iris varía No se ven ojos rosados	Cantidad de pigmento cutáneo puede variar	Neonatos casi siempre tienen cabello pigmentado	20/70
OCA3		Piel café rojiza (xantismo)	Cabello rojo	Normal
OCA4 no puede ser distinguido del OCA2 en los hallazgos clínicos				

Tabla 1.10. Tipos de albinismo oculocutáneo aislado y las manifestaciones clínicas asociadas.

Gen	Producto Genético	Locus	Tamaño	Nombre de la enfermedad	Prevalencia
TYR	Tirosinasa (TYR)	11q14.3	65 kb (529aa)	OCA1A	1:40.000
Gen p	OCA2	15q11.2-q12	345 kb (838aa)	OCA2 (café en africanos)	1:36. 000 europeos blancos 1:3.900-10.000 africanos
TYRP1	Relacionado con la proteína 1 de la Tirosinasa (TYRP1)	9p23	17 kb (536aa)	OCA3 (Albinismo Rufous)	Raro (europeos blancos; asiáticos)
MATP	Asociado con el transporte de membrana de la proteína (MATP)	5p13.3	40 kb (530aa)	OCA4	Raro europeos blancos; 1:85.000 en japoneses

Tabla 1.11. Genes asociados a albinismo oculocutáneo aislado, ubicación genómica y tamaño de los mismo así como los fenotipos asociados y la prevalencia de cada subtipo clínico.

Este trabajo se focalizará en el análisis de los tipo OCA1 y OCA2 de albinismo teniendo en cuenta su prevalencia en la población caucásica Europea.

1.1.2.2.2.3.1.2 ALBINISMO OCULAR LIGADO AL X (OA1)

El albinismo ocular tipo 1 (OMIM 300500), es la forma más común de albinismo ocular, cuya prevalencia es de 1 in 50,000 en caucásicos (King *et al.*, 1995). Esta patología presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X, donde los varones afectados manifiestan las mismas anomalías oculares que las descritas para el albinismo oculocutáneo, sin embargo las manifestaciones se restringen únicamente a nivel ocular, donde además se ha detectado la presencia de macromelanosomas en el epitelio pigmentado de la retina y en el epitelio epidérmico (Creel *et al.*, 1978; O'Donnell, *et al.*, 1976).

Debido al patrón de herencia, las mujeres portadoras no presentan gran manifestación clínica como resultado de la inactivación aleatoria del cromosoma X, aunque se han descrito algunos casos con sintomatología tan severa como la de los varones afectados, debido a una monosomía parcial del cromosoma X o a mutaciones en homocigosis en el gen responsable (Charles, *et al.*, 1992).

El gen cuyas mutaciones causan el albinismo ocular tipo 1 es el *GPR143* (NM_000273) (Bassi *et al.*, 1995), que abarca 40 kilobases de ADN genómico, contiene 9 exones y su ubicación cromosómica se encuentra localizada en Xp22.3 (Schiaffino *et al.*, 1995). Este gen codifica una glicoproteína de 404 aminoácidos perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteína G (Schiaffino *et al.*, 1996), que interviene en la ruta de señalización que regula la síntesis y crecimiento de los melanosomas (Cortese, *et al.*, 2005; Schiaffino & Tacchetti, 2005) (*figura 1.25.*).

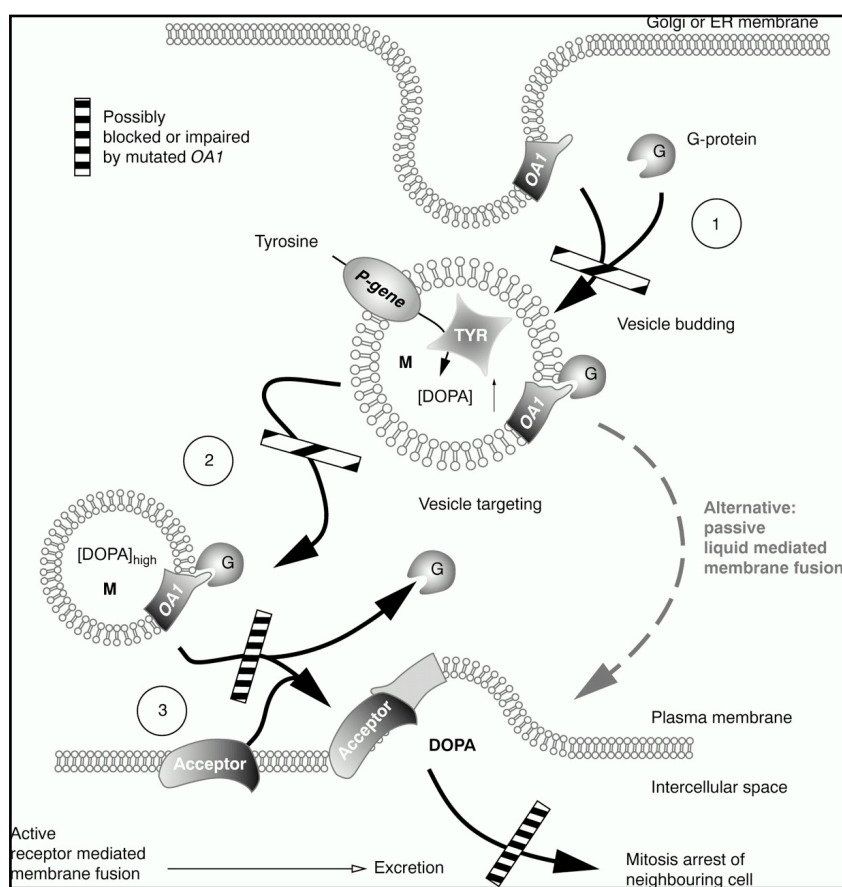


Figura 1.25. Síntesis de melanosomas. Imagen obtenida de Preising, *et al.*, 2001.

Según la base de datos del HGMD, se han identificado más de 60 mutaciones en el gen *GPR143*, algunas de ellas ocasionan un plegamiento defectuoso en la proteína, mientras que otras alteran la ruta de señalización, afectando la interacción del receptor con la proteína G o con su ligando (d'Addio *et al.*, 2000), que posiblemente está localizado en el interior del melanosoma (Staleva & Orlow, 2006). La mayoría de las mutaciones corresponden a mutaciones de cambio de aminoácido, aunque también se han descrito deleciones, preferentemente en el exón 2, por lo que se ha sugerido que este exón es susceptible a las deleciones, aunque se desconoce el mecanismo molecular subyacente (Schiaffino *et al.*, 1995).

1.2.2.2.3.2 AXENFELD RIEGER

El síndrome de Axenfeld Rieger (ARS) constituye un grupo clínico y genéticamente heterogéneo, que se caracteriza por manifestar anomalías del segmento anterior del ojo y de otros sistemas como anomalías dentarias (microdontia, hipodontia, y oligodontia), craneofaciales (hipoplasia maxilar, telecanto, hipertelorismo), presencia de piel redundante periumbilical, defectos cardíacos y anomalías de miembros (*figura 1.26*). El síndrome de Axenfeld-Rieger es una patología de herencia autosómica recesiva, de penetrancia completa y expresión variable, que está asociada a una elevada presión intraocular y presenta un riesgo del 50% de presentar glaucoma (Shields, 1983). Este síndrome engloba la anomalía Axenfeld caracterizada principalmente, por defectos periféricos del segmento anterior como el embriotoxon posterior (línea de Schwalbe prominente y anteriormente desplazada); la anomalía Rieger (anomalías periféricas con cambios adicionales en el iris en las que se incluye la corectopia, policoria, hipoplasia iridiana) y el síndrome Rieger (anomalías oculares y defectos sistémicos especialmente dentarios, craneofaciales y umbilicales) (Idrees, *et al.*, 2006).

Estas manifestaciones clínicas son resultado de mutaciones en los genes: *PITX2*, *FOXC1*, *PAX6*, *FOXO1A*, y *CYP11B1*, localizados en 4q25, 6p25, 11p13, 13q14 y 2p21-p22 respectivamente (Glaser, *et al.*, 1992; Nishimura *et al.*, 1998; Phillips *et al.*, 1996; Vicent *et al.*, 2001; Semina *et al.*, 1996; Tanwar, *et al.*, 2010)

Los genes *PITX2* (OMIM 601542) y *FOXC1* (OMIM 601090), codifican factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes y juegan un papel importante en la morfogénesis durante el desarrollo embrionario.

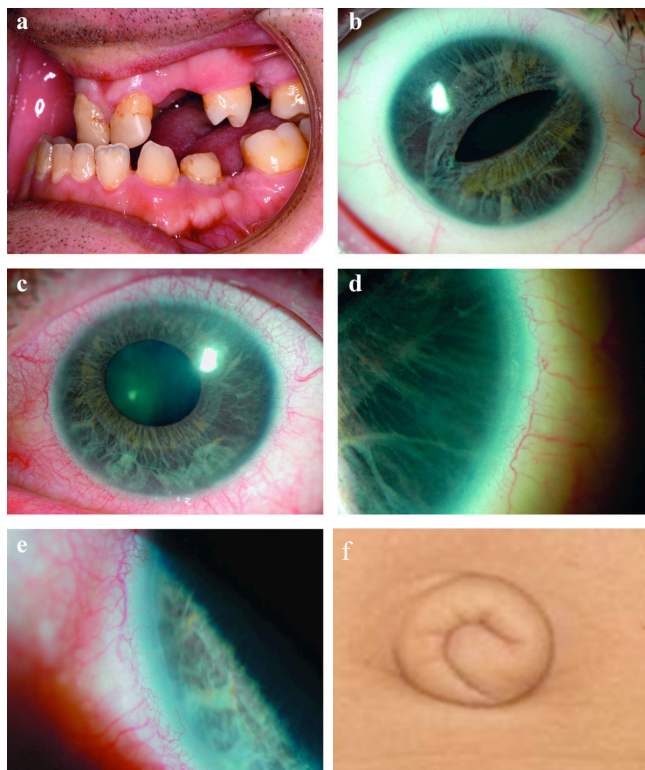


Figura 1.26. Manifestaciones clínicas del síndrome de Axenfeld Rieger a) microdentia y oligodontia; b) atrofia iridiana c) corectopia d) embriotoxon posterior de la córnea e) embriotoxon f) piel redundante del ombligo. Imagen obtenida de casesnetwork.wordpress.com.

El gen *PITX2* codifica un factor de transcripción que posee un homedominio de unión al ADN tipo “bicoid” y se expresa durante el desarrollo embrionario en diferentes tejidos del segmento anterior ocular y de tejidos no oculares como, los arcos branquiales, el músculo cardíaco y el esquelético (Gage, *et al.*, 1999). Se han descrito 4 transcritos (*PITX2A-D*), siendo la isoforma A la más conocida. Las tres primeras presentan un homeodominio de 60 aminoácidos y un extremo C terminal idéntico, pero se diferencian entre sí en el extremo amino terminal. El cuarto transcrito, *PITX2D*, podría inhibir la actividad del resto de las isoformas (Cox *et al.*, 2002). *PITX2* puede unirse a *FOXC1* e inhibir a los genes diana de este último, actuando de esta manera, como regulador negativo (Berry *et al.*, 2006).

FOXC1 codifica un factor de transcripción miembro de la familia FOX caracterizado por un dominio de unión a ADN conservado que está compuesto por 110 aminoácidos. Este gen juega un papel importante en la morfogénesis ocular, cardíaca y renal (Lehmann, *et al.*, 2003).

Las mutaciones en los genes *FOXC1* y *PITX2* son principalmente cambios puntuales localizados en los dominios de unión a ADN, aunque se han descrito varios casos de reordenamientos cromosómicos que incluyen alguno de estos *loci* y las manifestaciones clínicas de los pacientes no se diferencian de aquellos, a los que se han identificado mutaciones puntuales (Engenheiro *et al.*, 2007).

La misma mutación, ya sea para el gen *PITX2* como para *FOXC1*, puede ocasionar diferentes manifestaciones clínicas, incluso dentro de la misma familia. De forma general, las mutaciones en el gen *FOXC1* se asocian principalmente a pacientes con Axenfeld Rieger, que no manifiestan anomalías extraoculares y aquellos pacientes con anomalías sistémicas suelen presentar mayoritariamente, mutaciones en el gen *PITX2* (Tümer & Bach-Holm, 2009).

Los ensayos funcionales y los casos clínicos de deleciones, duplicaciones y anomalías cromosómicas sugieren que la dosis génica de ambos genes es esencial para un desarrollo normal, por lo que las alteraciones en los niveles proteicos de cualquiera de estos genes es el mecanismo mutacional del síndrome de Axenfeld Rieger (Nishimura *et al.*, 2001).

1.2.2.2.4 ENFERMEDADES MONOGENICAS ASOCIADAS A ANOMALÍAS CRANEOFACIALES

Las anomalías craneofaciales son un grupo complejo de patologías que representan entre el 10 y 15 % de las anomalías congénitas (Hunter & Rudd, 1976) y afectan a uno de cada 20.000 a 30.000 niños nacidos vivos, siendo las hendiduras orofaciales una de las más comunes y más graves.

Sin embargo la prevalencia individual de cada una de las condiciones varía considerablemente a lo largo de las regiones geográficas y entre los diferentes grupos étnicos.

Estas anomalías conllevan desde la afectación de la base del cráneo hasta el cierre prematuro de diversas estructuras de la bóveda que genera desde el aumento de la presión cerebral e hidrocefalia hasta las diferentes malformaciones faciales.

La etiología de las anomalías craneofaciales es heterogénea, pudiendo ser (Cifuentes-Cifuentes & Arteaga-Díaz, 2008):

- Monogénica: en el 5% de los casos. En este estudio nos centraremos en la holoprosencefalia

- Cromosómica: la mayoría de las cromosomopatías presenta anomalías craneofaciales, desde moderadas hasta graves:

 - La trisomía 21, cursa con anomalías faciales menores y sólo en el 1 % de los casos con una hendidura labial o palatina (Källén *et al.*, 1998).

 - En la trisomía 18 la anomalía facial más frecuente es la micrognatia acompañada sólo en el 10 % de los casos de hendiduras labiales o palatinas.

 - En la trisomía 13 el 90 % de los casos presenta una grave dismorfia facial.

- Multifactorial: Las hendiduras labiopalatinas y los defectos de cierre del tubo neural.

- Teratogénica: el ácido valproico, al igual que casi todos los medicamentos anticonvulsivantes, tiene efecto teratogénico, afectando el sistema nervioso y el desarrollo craneofacial, cardiovascular y musculoesquelético. Se calcula que del 1 al 2% de los fetos expuestos a ácido valproico desarrollarán defectos en el tubo neural.

1.2.2.2.4.1 HOLOPROSENCEFALIA

La holoprosencefalia (HPE) es una malformación cerebral heterogénea, producida por una división incompleta del prosencéfalo, entre los días 18 y 28 de gestación. En humanos, la incidencia se estima a 1 de cada 250 concepciones y 1 de cada 16.000 recién nacidos vivos (Cohen, 1989a).

Se clasifica en tres tipos, según la severidad de las anomalías cerebrales: lobar, semilobar y alobar (Demyer, *et al.*, 1964) (*figura 1.27*). También se ha observado otro subtipo más leve, llamado variante media interhemisférica (MIHF) o sintelencefalia (Delezoide, *et al.*, 1990).

Además, en la mayoría de los casos se observan defectos en la línea media como: ciclopía, proboscis y labio leporino o paladar hendido mediano o bilateral en las formas graves, e hipotelorismo ocular o incisivo único central mediano en formas menos graves (*tabla 1.12*).

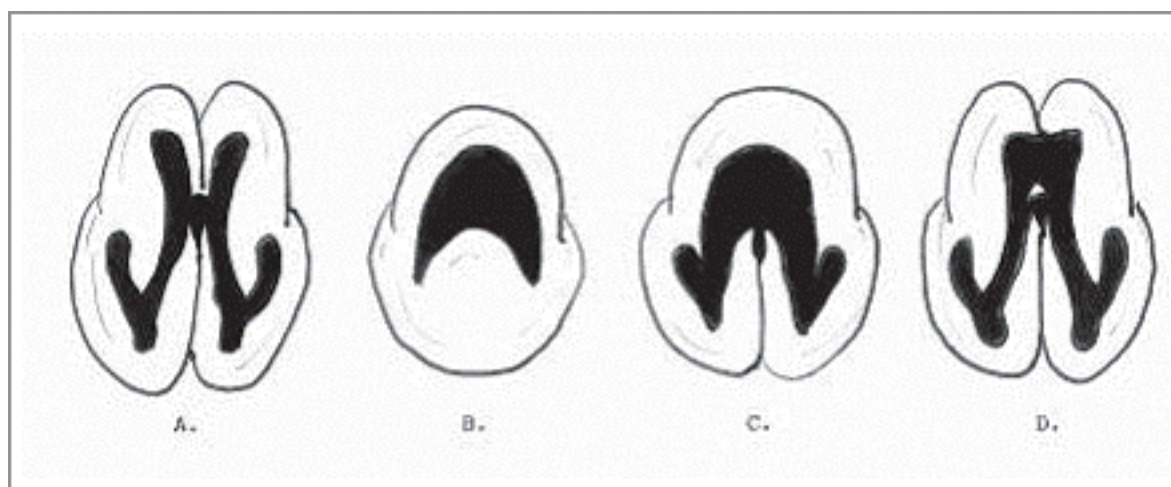


Figura 1.27. Esquema del sistema ventricular. a) normal; b) holoprosencefalia alobar; c) holoprosencefalia semilobular; d) holoprosencefalia lobar.

Anomalías craneofaciales asociadas con la holoprosencefalia.		
Tipo facial	Características principales	Cerebro
I. Ciclopia	Monoftalmia media; anoftalmia; probosis por encima del globo ocular presente o ausente	Holoprosencefalia alobar
II. Etmocefalia	Hipotelorismo ocular con probosis ubicada entre las dos órbitas	Holoprosencefalia alobar
III. Cebocefalia	Hipotelorismo ocular; nariz con orificio nasal único terminado en dedo de guante	Usualmente holoprosencefalia alobar
IV. Labio leporino medio	Hipotelorismo ocular; nariz aplanada; labio leporino medio	Usualmente holoprosencefalia alobar
V. Dismorfismo facial menos severo	Características variables incluyendo hipotelorismo ocular o hipertelorismo; nariz aplanada; labio leporino unilateral o bilateral; dismorfismo facial mínimo en algunos casos	Holoprosencefalia semilobar o lobar.

Tabla 1.12. Anomalías craneofaciales asociadas con la holoprosencefalia. Imagen obtenida de Cohen, 1989b

La etiología de la HPE es muy heterogénea. Este defecto congénito puede estar asociado a: anomalías cromosómicas como la trisomía 13, la trisomía 18 y la triploidía; a varios síndromes malformativos múltiples con un cariotipo normal; al síndrome Smith-Lemli-Opitz, al síndrome Pallister Hall; al síndrome de delección 22q11; o incluso se puede manifestar de forma aislada, en la que se han identificado al menos 12 genes asociados a Holoprosencefalia, de los cuales, los más frecuentemente mutados son los genes: *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*, *PTCH*, *GLI2* y *TDGF1* (Roessler & Muenke, 2010).

El gen *SHH* (Sonic Hedgehog) es el gen mayormente implicado en la holoprosencefalia (Dubourg *et al.*, 2004). Este gen que está localizado en la región cromosómica 7q36 (Gurrieri *et al.*, 1993), consta de 3 exones, y codifica una proteína que juega un papel importante en la regulación de la organogénesis y morfogénesis de la región ventral del tubo neural, del eje anteroposterior de miembros y de los somitas ventrales en vertebrados. La proteína SHH se sintetiza en forma de precursor que sufre un proceso autocatalítico ya que el dominio carboxilo terminal posee una actividad proteasa y colesterol transferasa que al transferir moléculas de colesterol al dominio amino terminal mediante enlace covalente, genera un amino terminal activo que funciona como regulador transcripcional de genes críticos en la formación de la mayoría de las estructuras craneofaciales (Ming, *et al.*, 1998).

1.2.2.3 ENFERMEDADES CON HERENCIA MULTIFACTORIAL

Muchos de los defectos congénitos aislados no asociados a síndrome como la espina bífida, el paladar y/o labio hendido son más frecuentes en el entorno familiar que en la población general, sin embargo no presenta una herencia mendeliana sino multifactorial, donde interactúan múltiples factores genéticos y factores ambientales. Ninguno de los factores por separado generan la enfermedad es la suma aditiva de los efectos de ambos factores lo que contribuye al fenotipo (Eurocat central Registry, 2004). Este modelo de herencia ha sido asociado como la causa mayoritaria de las malformaciones cardíacas aisladas y de aparición familiar errática, con un riesgo de recurrencia menor a la que cabría esperar por herencia mendeliana (Sanchez-Cascos, 1978).

1.2. ORIENTACIÓN CLÍNICA Y REPRODUCTIVA: CONSEJO GENÉTICO

Las enfermedades previamente citadas pueden detectarse ecográficamente o a nivel postnatal. El diagnóstico tanto clínico como molecular de las enfermedades hereditarias permite ofrecer un adecuado consejo genético al paciente, siendo extensible al resto de sus familiares. Tiene lugar tanto antes como después de una prueba o cribados genéticos e incluso en ausencia de los mismos.

El consejo genético según la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica, se define como el procedimiento destinado a informar a una persona sobre las posibles consecuencias para él o su descendencia de los resultados de un análisis o cribado genéticos y sus ventajas y riesgos y, en su caso, para asesorarla en relación con las posibles alternativas derivadas del análisis. Algunos autores de la literatura han definido consejo genético al proceso por el cual un individuo o los miembros de una familia, con riesgo de padecer una determinada enfermedad hereditaria, son informados de las consecuencias de la enfermedad, de la probabilidad de padecerla y transmitirla, y de las formas de prevenirla o reducir sus efectos (Kelly, 1986).

Las razones por las que los pacientes acuden a consulta para consejo genético suelen ser porque: a) alguno de sus familiares presenta una enfermedad hereditaria; b) han tenido descendencia previa que manifestaba enfermedad genética, defecto congénito, anomalías cromosómicas o retraso mental; c) existe consanguinidad en la familia; d) la mujer presenta edad avanzada y por tanto con riesgo de descendencia con anomalías cromosómicas; e) los pacientes tienen dificultades para interpretar los resultados de una prueba prenatal; f) la embarazada ha tenido una posible exposición a teratógenos; g) quieren conocer las opciones reproductivas posibles en su caso; o por infertilidad (Pierce, 2010).

El principal pilar del asesoramiento genético es determinar la naturaleza del carácter hereditario para proporcionar la información requerida al paciente, así como determinar la evolución a medio-largo plazo, las complicaciones clínicas o efectos que se puedan derivar en el desarrollo intelectual, es decir necesidades sociales y posibles tratamientos o medidas paliativas.

Para recabar la información necesaria, es indispensable realizar un adecuado árbol genealógico, captando la información necesaria para cada carácter de al menos tres generaciones a partir del consultante o *probandus*, al cual se realizarán las preguntas requeridas en cada caso de una manera ordenada, a fin de facilitar la obtención de la información. Así se obtendrá el patrón de herencia del carácter y posteriormente el cálculo de riesgos de segregar el carácter a la siguiente generación. A continuación se transmitirá la información de una forma comprensible sobre las cifras de riesgo, los mecanismos de transmisión de la enfermedad y se responderán a las preguntas establecidas por el paciente o por los familiares del individuo afecto para facilitar la comprensión de la patología en cuestión. Finalmente se explicarán las opciones del manejo del carácter (Aytés, 2002).

De entre las opciones reproductivas, existen el diagnóstico genético prenatal invasivo y no invasivo, diagnóstico genético preimplantacional, donación de gametos, o adopción (Tsui *et al.*, 2011).

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es una alternativa reproductiva aplicada al diagnóstico, recientemente. Los criterios de inclusión para diagnóstico preimplantacional son los siguientes: a) el paciente o algún familiar presenta una enfermedad genética que reduce su calidad y esperanza de vida; b) existe riesgo de recurrencia de una concepción afectada de una enfermedad genética determinada, o riesgo de recurrencia de abortos relacionado con una anomalía cromosómica estructural; c) el diagnóstico genético en célula única de una determinada enfermedad que se pueda realizar de forma certera; d) existe la posibilidad de curar o aumentar la esperanza de vida a un descendiente previo afecto de una enfermedad grave, mediante el trasplante de células madre con sangre de cordón a partir de un descendiente con sistema HLA idéntico (Thornhill *et al.*, 2004).

De esta manera, ante una pareja que acude a consejo genético para conocer las posibles opciones reproductivas, el profesional debe comunicar toda la información posible así como las ventajas e inconvenientes, transmitiendo la información de una forma clara y veraz, para que la pareja tome las decisiones que la pareja crea oportuna de forma libre y con conocimiento de los hechos de acuerdo con su esquema ético y moral (Maciá, *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue la caracterización genético-clínica prenatal y postnatal de pacientes con defectos congénitos de baja prevalencia a nivel cardíaco, craneofacial esquelético y ocular mediante la aplicación de técnicas citogenéticas y moleculares así como el diseño de protocolos de actuación, para poder ofrecer a dichos pacientes y a sus familiares un adecuado consejo genético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterización genético-clínica de restos abortivos con defectos congénitos mayores y menores con alteración cardíaca, craneofacial y/o esquelética.
- b. Caracterización genético-clínica de pacientes con síndromes clínicamente reconocibles de baja prevalencia con afectación cardíaca, craneofacial esquelética y ocular.
- c. Puesta a punto de las técnicas citogenético-moleculares para el análisis de las regiones genómicas y el cribado de genes asociados a la manifestación fenotípica de dichos pacientes.
- d. Correlación genotipo-fenotipo de cada una de las enfermedades estudiadas.
- e. Aplicación y optimización de las técnicas moleculares para el abordaje de los diagnósticos genético prenatal (invasivo y no invasivo) y preimplantacional.
- f. Desarrollo de algoritmos de actuación para el abordaje diagnóstico de: restos abortivos y de patologías en pacientes con síndromes clínicamente reconocibles, con el fin de ofrecer todos los recursos diagnósticos disponibles dentro de un marco de consejo genético personalizado.

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES

3.1.1 PACIENTES ESTUDIADOS

Los pacientes seleccionados en este estudio comprendieron aquellos casos con manifestaciones clínicas de anomalías cardíacas, anomalías esqueléticas, anomalías craneofaciales o anomalías oculares de forma aislada o formando parte de un cuadro polimalformativo, tanto a nivel prenatal como postnatal, referidos al departamento de genética de la Fundación Jiménez Díaz, durante el periodo de septiembre de 2007, hasta marzo de 2012. Los datos clínicos perinatales y postnatales se obtuvieron de las historias clínicas de cada caso.

En el caso de los abortos, se realizó un registro fotográfico y radiológico de los restos abortivos, creando una base de datos de defectos congénitos durante el periodo de estudio. Asimismo, se obtuvo tanto el informe del servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz, como la historia o datos clínicos ofrecidos de los restos abortivos referidos de nuestro centro o de las clínicas privadas, de los cuales se recogió la edad de los progenitores en el momento y la edad gestacional en el momento del legrado, así como el diagnóstico ecográfico.

Las muestras empleadas en este estudio procedieron del Biobanco RD/009/0076/00101 de la Fundación Jiménez Díaz. Para todas las muestras, se obtuvo el consentimiento informado correspondiente, de acuerdo con la Ley 14/2007 de investigación biomédica y según los principios establecidos en la declaración de Helsinki (<http://www.wma.net>) y posteriores actualizaciones (Seúl, 2008).

3.1.1.1. RESTOS ABORTIVOS ESTUDIADOS

De todos los restos abortivos referidos al servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz, se seleccionaron durante el periodo 2007-2011, 43 casos diferidos desde el servicio de Ginecología y Obstetricia de la Fundación Jiménez Díaz, así como, de clínicas abortivas privadas, por presentar malformaciones congénitas múltiples o aisladas como: cardiopatía estructural, anomalías esqueléticas de miembros superiores y/o inferiores, holoprosencefalia u otras alteraciones craneofaciales.

De los **43** restos abortivos seleccionados para este estudio, la distribución fue la siguiente:

- *Primer trimestre de gestación: 16 casos*
- *Segundo trimestre de gestación: 19 casos*
- *Periodo gestacional desconocido: 8 casos*

En la siguiente tabla, se detallan los abortos estudiados junto con los datos clínicos de partida, las semanas de gestación y la edad de los progenitores en el momento de la interrupción del embarazo, indicando asimismo, la recogida de información adicional como el registro fotográfico, radiológico y el informe emitido por el departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz (*tabla 3.1*):

Nº RESTO ABORTIVO	SEMANAS DE GESTACIÓN	EDAD MATERNA ♀ / EDAD PATERNA ♂	DATOS CLÍNICOS	REGISTRO FOTOGRÁFICO	REGISTRO RADIOLÓGICO	INFORME ANATOMÍA PATOLÓGICA
AB-446	N/D	39 años ♀ / N/D ♂	Sospecha de síndrome de Holt-Oram: Feto con cardiopatía, agenesia de radio y, de pulgar derecho.	✓	✗	✗
AB-1054	22 semanas	40 años ♀ / N/D ♂	Feto con malformación de miembros	✗	✗	✗
AB-1081	22 semanas	N/A ♀ / N/D ♂	Sospecha de síndrome de DiGeorge	✗	✗	✗
AB-1123	N/D	34 años ♀ / N/D ♂	Feto polimalformado. 2º Aborto con mismos marcadores ecográficos alterados que feto mortinato previo	✓	✓	✓
AB-1138	N/D	30 años ♀ / N/D ♂	Feto con malformación abierta de la cara	✗	✗	✗
AB-1140	12 semanas	N/D ♀ / N/D ♂	Feto acráneo. Feto por fecundación in vitro	✗	✗	✗
AB-1142	N/D	N/D ♀ / N/D ♂	Feto con displasia ósea, ciclopía y artrogriposis	✗	✗	✗
AB-1160	N/D	32 años ♀ / 33 años ♂	Feto con hidrocele e higroma quístico de 8 mm por ductus venoso	✗	✗	✓
AB-1162	13 semanas	38 años ♀ / N/D ♂	Feto acráneo con fisura palatina y gastrosquisis	✓	✗	✓
AB-1180	21 semanas	32 años ♀ / N/D ♂	Feto con malformación cardíaca	✗	✗	✗

AB-1212	22 semanas	34 años ♀/ N/D ♂	Feto con displasia ósea con micromelia	✓	✓	✓
AB-1234	16 semanas	31 años ♀/ N/D ♂	Feto polimalformado	✗	✗	✗
AB-1239	15 semanas	38 años ♀/ 44 años ♂	Feto con hidrops fetal	✓	✗	✓
AB-1241	22 semanas	29 años ♀/ N/D ♂	Feto polimalformado	✓	✓	✓
AB-1242	23 semanas	37 años ♀/ N/D ♂	Malformación fetal. IVE por CIR precoz y severo. El flujo Doppler fue patológico.	✓	✓	✗
AB-1256	7 semanas	32 años ♀/ 33 años ♂	Feto polimalformado	✗	✗	✓
AB-1281	13 semanas	30 años ♀/ N/D ♂	Feto con displasia ósea o focomelia	✓	✓	✓
AB-1283	20 semanas	37 años ♀/ N/D ♂	Feto con CIR precoz. Alteración del flujo de arterias uterinas. Los datos ecográficos fueron normales. Macroscópicamente, en el aborto se observó retrognatia y genitales ambiguos.	✓	✓	✗
AB-1289	12 semanas	N/D ♀/ N/D ♂	Hidrops fetal	✓	✗	✓
AB-1327	11 semanas	35 años ♀/ N/D ♂	Feto acráneo con doble cérvix y doble cavidad uterina	✗	✗	✗
AB-1330	12 semanas	38 años ♀/ 59 años ♂	Feto con TN 3.5 mm en las 12 semanas de gestación.	✓	✗	✓
AB-1345	N/D	37 años ♀/ N/D ♂	Feto con cardiopatía: sospecha de doble salida del ventrículo derecho	✗	✗	✗
AB-1362	N/D	39 años ♀/ N/D ♂	Feto con posible anemia de Fanconi	✗	✗	✓
AB-1373	24 semanas	N/D ♀/ N/D ♂	Síndrome de DiGeorge Feto con hendidura paladar y genitales ambiguos	✓	✗	✗
AB-1379	22 semanas	28 años ♀/ N/D ♂	Anemia de Fanconi. Feto con malformación de miembros	✓	✓	✓
AB-1404	9 semanas	27 años ♀/ N/D ♂	Feto malformado con regresión caudal.	✓	✗	✗
AB-1432	16 semanas	42 años ♀/ N/D ♂	Feto muerto intraútero e Hipertrofia clitoriana	✓	✗	✓
AB-1438 (BC-3271)	12+4 semanas	34 años ♀/ N/D ♂	Feto con hidrops fetal, artrogriposis y ectrodactilia.	✓	✗	✓

AB-1459	21 semanas	30 años ♀/ N/D ♂	Feto con malformación esquelética, hidrops fetal pie varo, hiperextensión de columna cervical y derrame pleural	✓	✓	✓
AB-1484	17 semanas	45 años ♀/ N/D ♂	Feto polimalformado	✓	✓	✓
AB-1501	10 semanas	33 años ♀/ N/D ♂	Sirenomelia	✗	✗	✓
AB-1505	N/D	41 años ♀/ N/D ♂	Síndrome de Arnold Chiari	✗	✗	✗
AB-1509	7 semanas	34 años ♀/ N/D ♂	Embrión con higroma nuchal de 4 mm, sindactilia del primer y segundo dedo del pie derecho	✓	✗	✓
AB-1517	21 semanas	32 años ♀/ N/D ♂	Holoprosencefalia: 3º aborto con mismos marcadores ecográficos que el segundo aborto y el 1º fue un aborto espontáneo	✓	✓	✓
AB-1529	22 semanas	31 años ♀/ N/D ♂	Feto con amelia superior bilateral	✓	✓	✓
AB-1544	10 semanas	31 años ♀/ N/D ♂	Feto con defecto de pared abdominal y ausencia ecográfica de miembros inferiores	✓	✗	✗
AB-1577	22 semanas	30 años ♀/ N/D ♂	Feto con cardiopatía compleja	✓	✓	✗
AB-1687	22 semanas	27 años ♀/ N/D ♂	Alteraciones en los marcadores ecográficos de feto por FIV	✓	✓	✓
AB-1755	15 semanas	29 años ♀/ N/D ♂	Feto con riñón en herradura y oligoamnios severo	✗	✗	✗
AB-1889	21 semanas	32 años ♀/ N/D ♂	Acondroplasia fetal	✓	✓	✓
AB-2018	22 semanas	25 años ♀/ N/D ♂	Feto con miembros superior alterado: Acortamiento de ambos antebrazos: (> de radio que de cúbito).	✓	✓	✗
AB-2019	22 semanas	39 años ♀/ N/D ♂	Feto con ventriculomegalia derecha, CIV perimembranosa, arteria pulmonar dilatada acortamiento bilateral de miembros superiores (cúbito derecho corto con ausencia de cúbito izquierdo, focomelia izquierda hipoplasia de antebrazo derecho),	✓	✓	✗
AB-2036	22 semanas	36 años ♀/ N/D ♂	Feto con agenesia de antebrazo derecho.	✓	✗	✓

Tabla 3.1. Abortos seleccionados para el estudio. Se indican las semanas de gestación y la edad de los progenitores en el momento de la interrupción del embarazo, así como los defectos congénitos de los abortos. El tic verde indica que existe registro, por el contrario, la cruz roja indica que no se ha obtenido el registro.

3.1.1.2. FAMILIAS ESTUDIADAS

En este estudio se analizaron un total de 69 familias afectadas de defectos congénitos cardíacos; oculares y/o esqueléticos. Estas familias, se clasificaron en función de la sospecha clínica inicial de los defectos congénitos asociados a síndromes clínicamente reconocibles que englobaban anomalías esqueléticas, cardíacas y/o oculares de muy baja prevalencia y que para la mayoría de ellas, no existía centro de referencia en España, aunque para algunas como el síndrome de Marfan existían unidades clínicas.

La mayoría de las familias estudiadas pertenecieron a la población española, sin embargo, un grupo de ellas correspondían a una población diferente, especificada en cada caso en el árbol genealógico correspondiente (*ver sección 3.1.1.2.1*).

Las patologías estudiadas en las familias seleccionadas en este trabajo, los genes implicados en las mismas y los protocolos de actuación empleados en cada caso se muestran en la siguiente tabla (*tabla 3.2*):

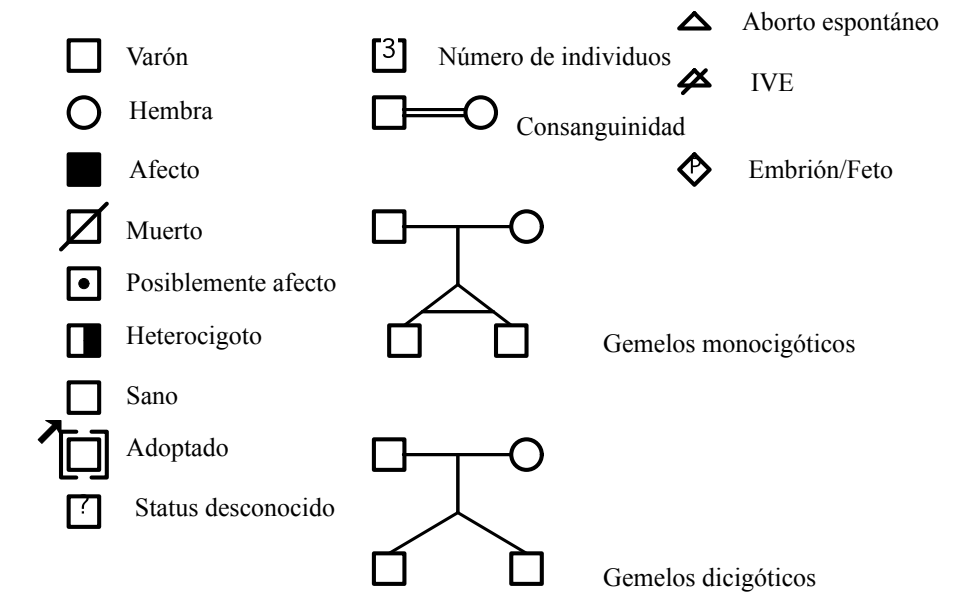
Sospecha clínica inicial	Número de familias estudiadas	Protocolo de actuación
<i>Síndrome de delección 22q11</i>	9 familias	-Aquellas familias con FISH negativo: ↳ 1º MLPA salsa p250 ↳ 2º secuenciación del gen <i>TBX1</i>
<i>Síndrome de Marfan</i>	13 familias	-Aquellas familias que solicitaron secuenciación completa ↳ 1º Estudio completo del gen <i>FBNI</i> ↳ 2º Confirmación de las mutaciones identificadas ↳ En los casos negativos por secuenciación: ↳ 3º MLPA salsa p065 y p066 -En aquellas familias con petición de DGP: ↳ 1º Confirmación de mutación ↳ 2º Estudio de informatividad mediante microsatélites polimórficos
<i>Displasia acromesomélica tipo Grebe</i>	1 familia	↳ 1º Secuenciación del gen <i>CDMPI</i> en progenitores ↳ 2º Diagnostico prenatal a partir de vellosidad corial ↳ 3º Consejo Genético

<i>Displasia Oculodentodigital</i>	1 familia	<ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º Consejo Genético ↳ 2º Secuenciación de la mutación en progenitores ↳ 3º Diagnóstico prenatal a partir de vellosidad corial ↳ 4º Diagnóstico prenatal no invasivo mediante minisequenciación de la mutación a partir de ADN fetal disponible en plasma materno
<i>Síndrome de Holt-Oram</i>	15 familias	<ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º secuenciación del gen <i>TBX5</i> ↳ 2º MLPA salsa p179 y p180 <p>-Selección de casos para: Microarray de 400 k de la empresa <i>Agilent Technologies</i>.</p>
<i>Síndrome de Albinismo Oculocutáneo</i>	11 familias	<p>-Aquellas familias de población caucásica</p> <ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º Secuenciación completa del gen <i>TYR</i> en población caucásica ↳ 2º Secuenciación de exones más frecuentemente mutados en el gen <i>OCA2</i> <p>-Aquellas familias de población africana</p> <ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º Secuenciación completa del gen <i>OCA2</i> en población caucásica ↳ 2º Secuenciación completa del gen <i>TYR</i> en población caucásica ↳ Aquellos casos negativos para secuenciación: ↳ 3º Análisis de deleciones por qPCR/fragmento MHB/MLPA salsa p235 (Noviembre 2011)
<i>Síndrome de Albinismo Ocular tipo 1</i>	15 familias	<ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º Secuenciación parcial del gen <i>GPR143</i> ↳ 2º MLPA Salsa p054 <p>-En aquellas parejas con mutación de origen paterno que solicitaron DP:</p> <ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º Diagnóstico prenatal no invasivo mediante la determinación de sexo fetal a partir de plasma materno
<i>Síndrome de Axenfeld Rieger</i>	4 familias	<p>-Aquellas familias con solo anomalías oculares:</p> <ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º Secuenciación del gen <i>FOXC1</i> ↳ 2º MLPA Salsa p054 y MLPA-MC001 ↳ 3º Secuenciación de exones 5 y 6 del gen <i>PITX2</i> <p>-Aquellas familias con anomalías sistémicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ↳ 1º Secuenciación de exones 5 y 6 del gen <i>PITX2</i> ↳ 2º MLPA Salsa p054 y MLPA-MC001 ↳ 3º Secuenciación del gen <i>FOXC1</i>

Tabla 3.2. Protocolo de actuación según las patologías, los genes analizados y las familias estudiadas.

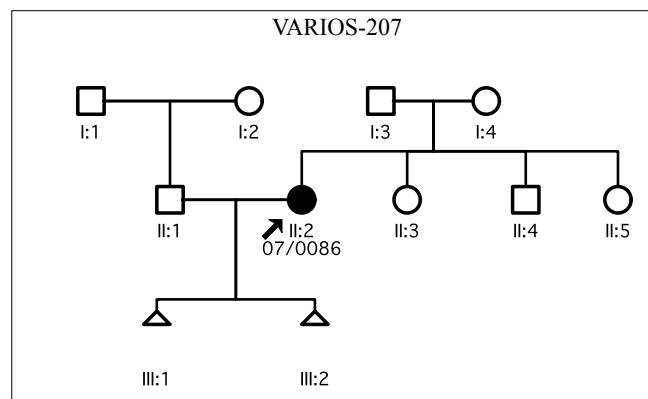
3.1.1.2.1 ÁRBOLES GENEALÓGICOS

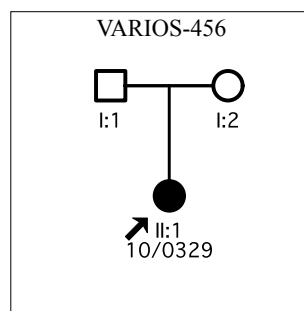
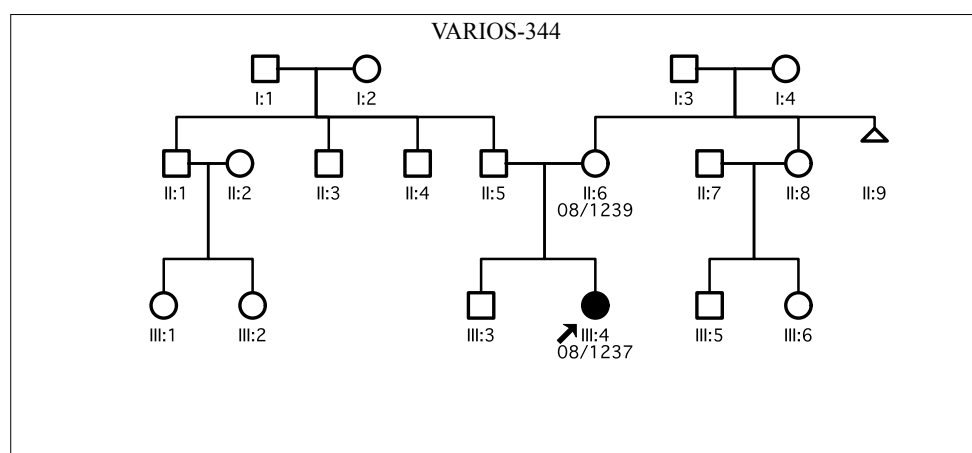
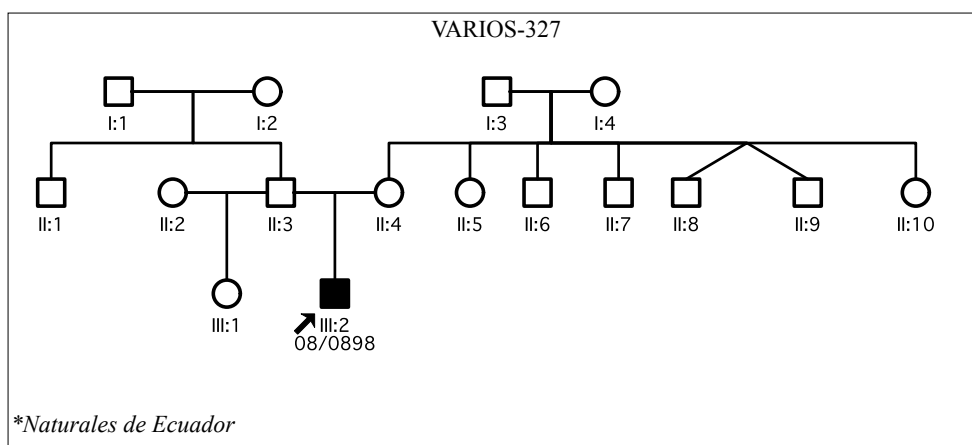
3.1.1.2.1.1. LEYENDA GENERAL DE LOS ÁRBOLES GENEALÓGICOS

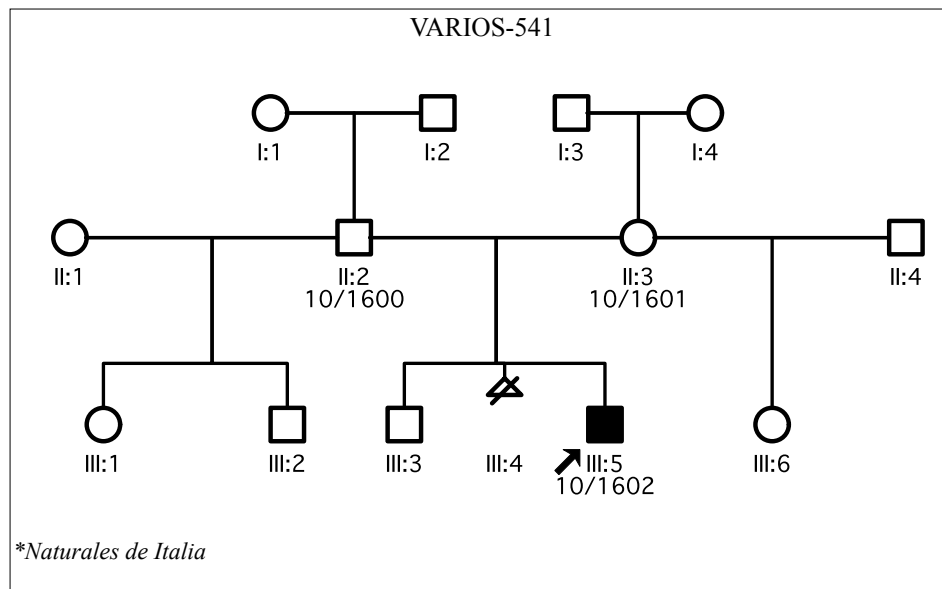
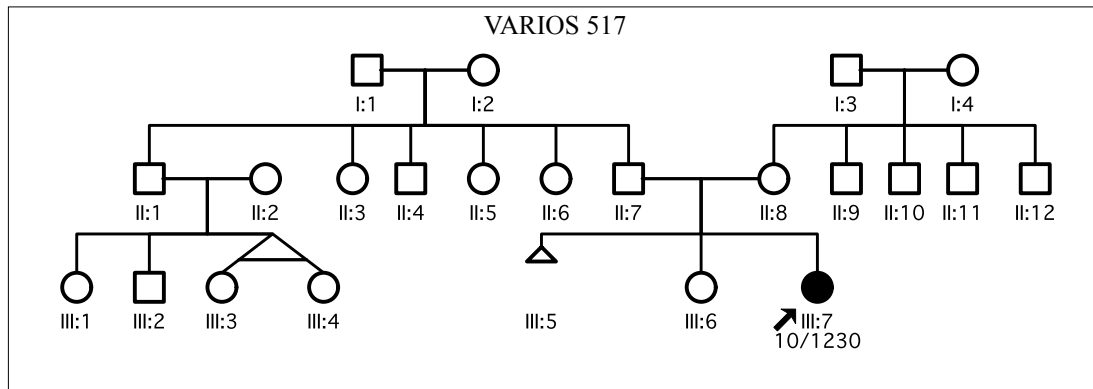
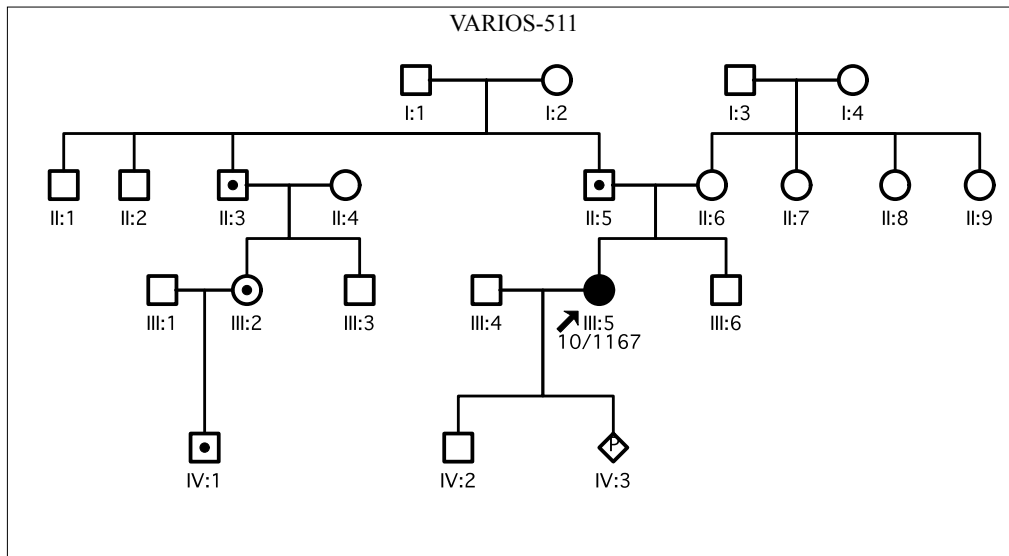


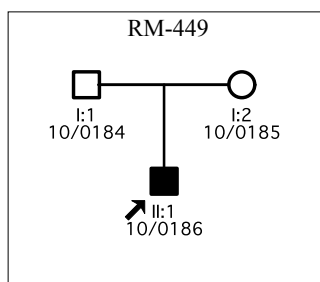
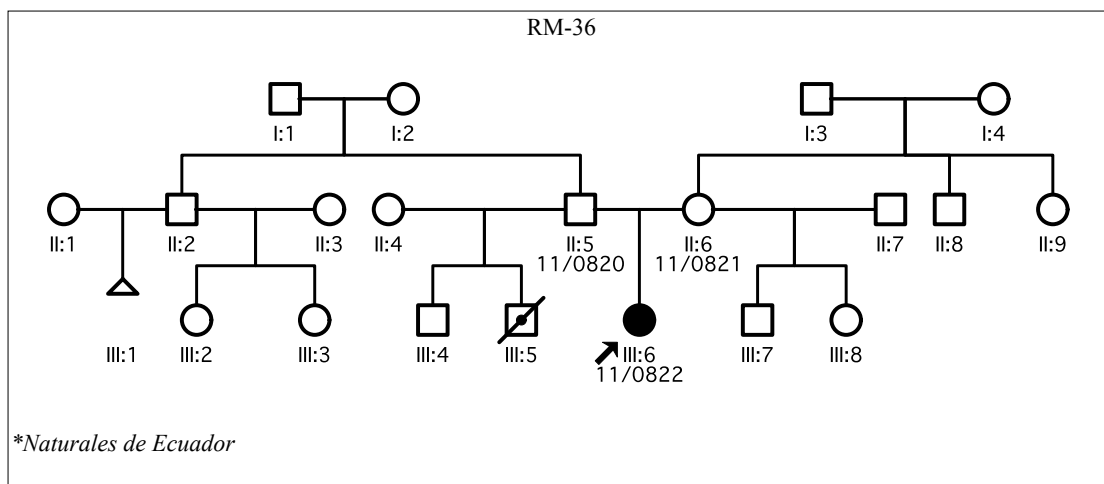
3.1.1.2.1.2 ÁRBOLES GENEALÓGICOS

3.1.1.2.1.2.1- Familias con sospecha de síndrome de delección 22q11

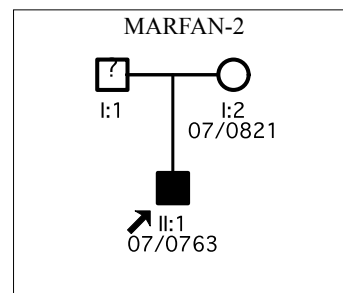
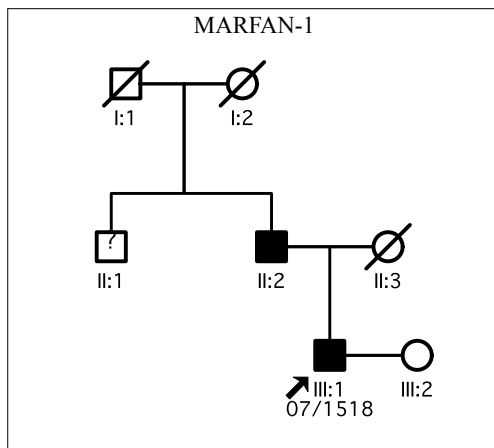


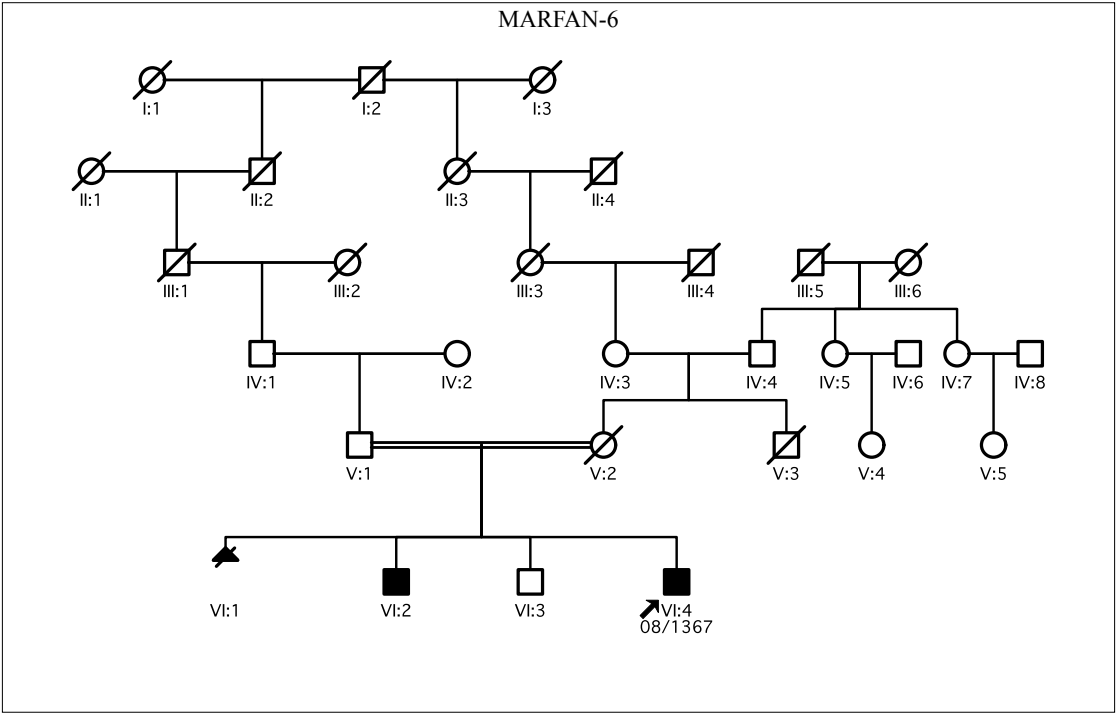
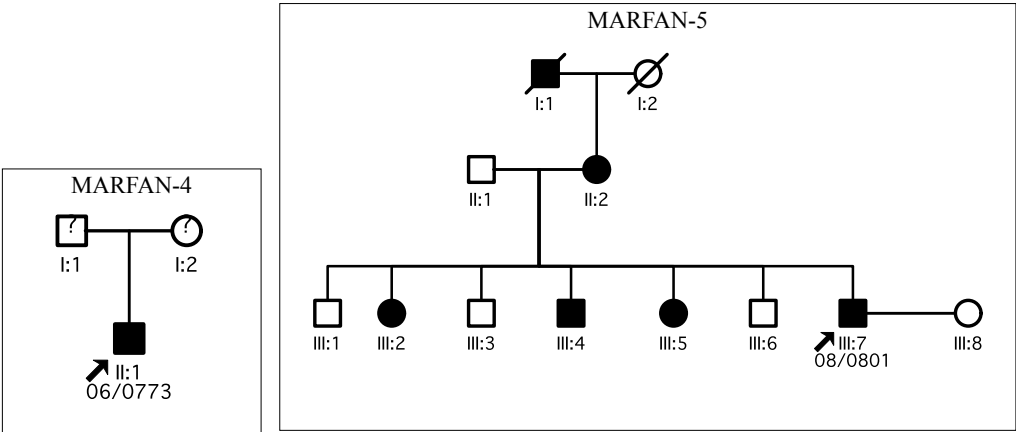
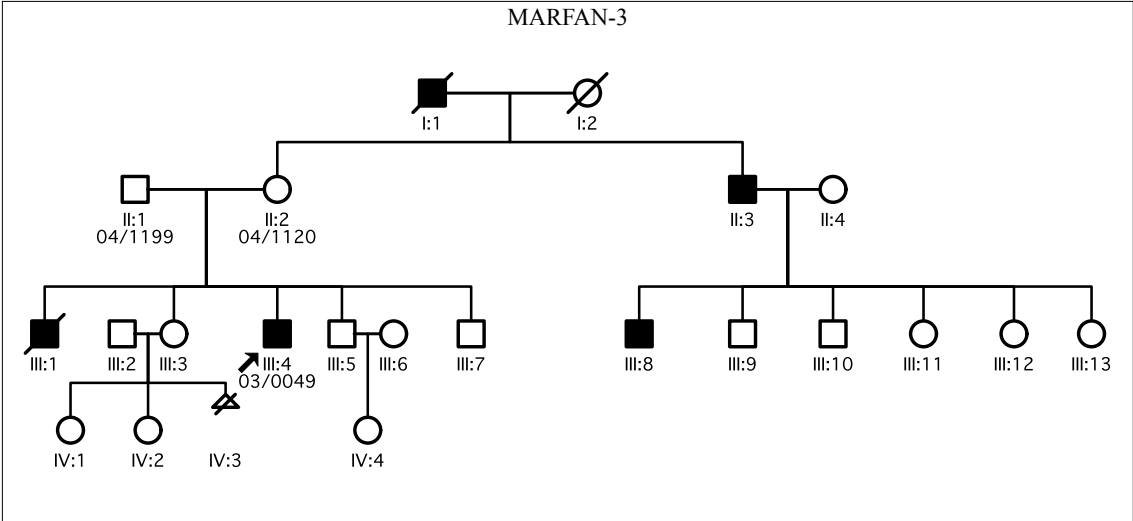


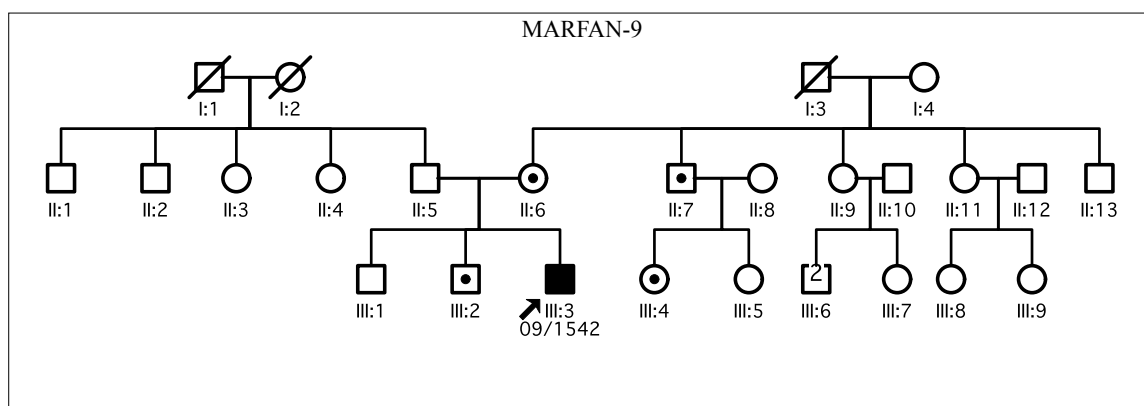
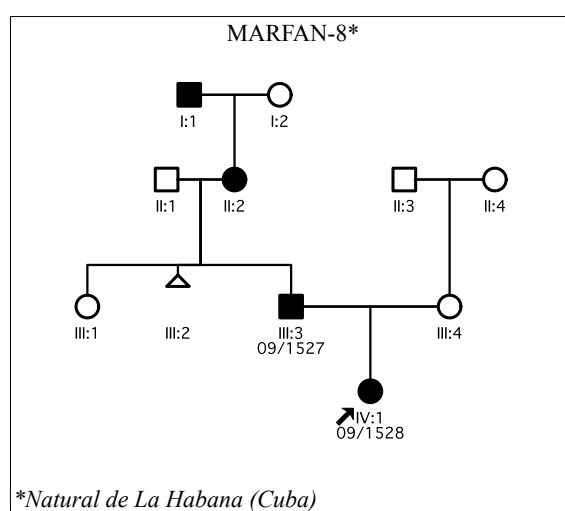
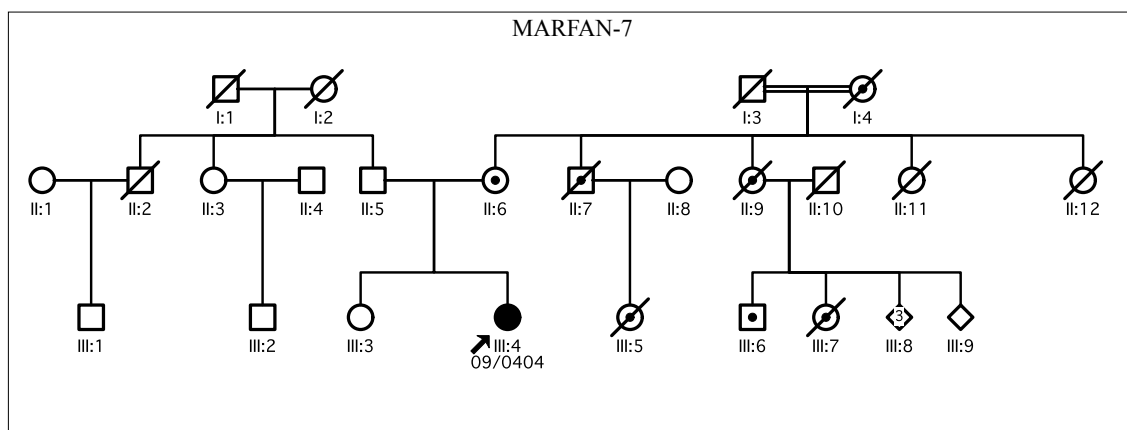


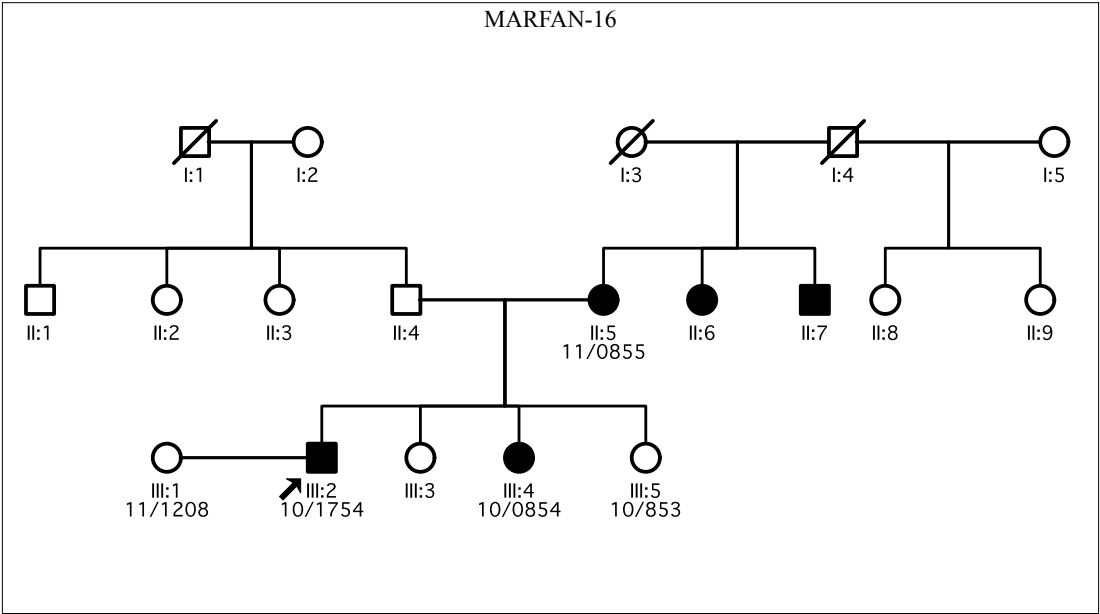
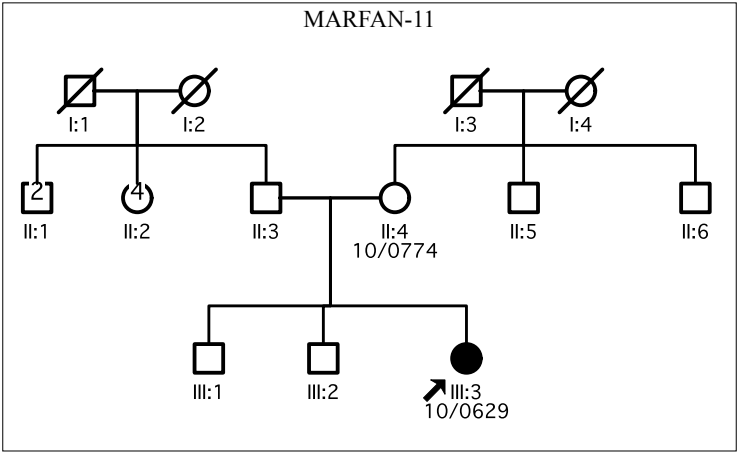
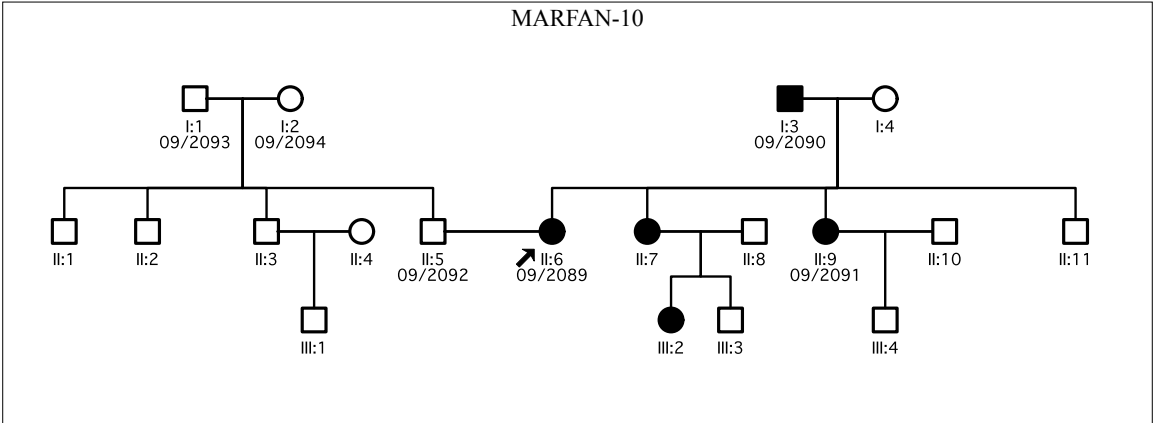


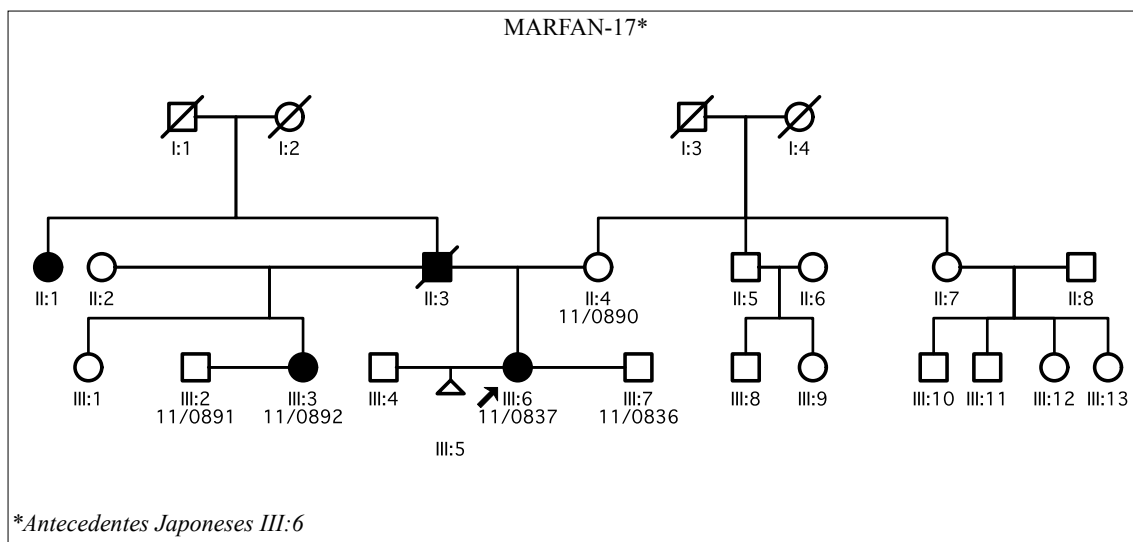
3.1.1.2.1.2.2 Familias con sospecha de síndrome de Marfan



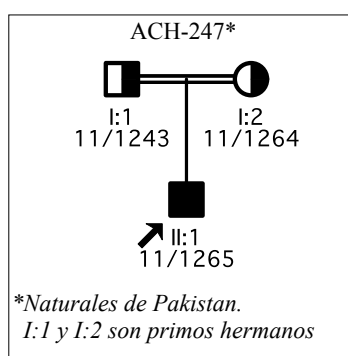




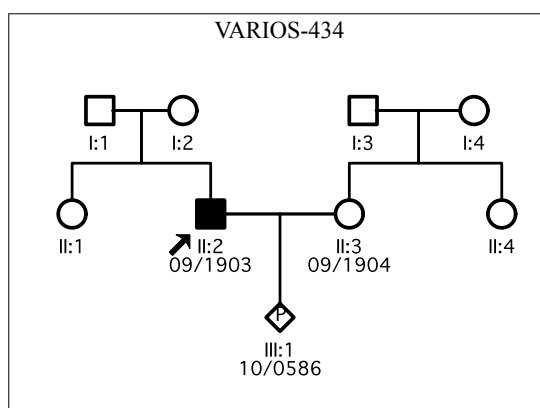




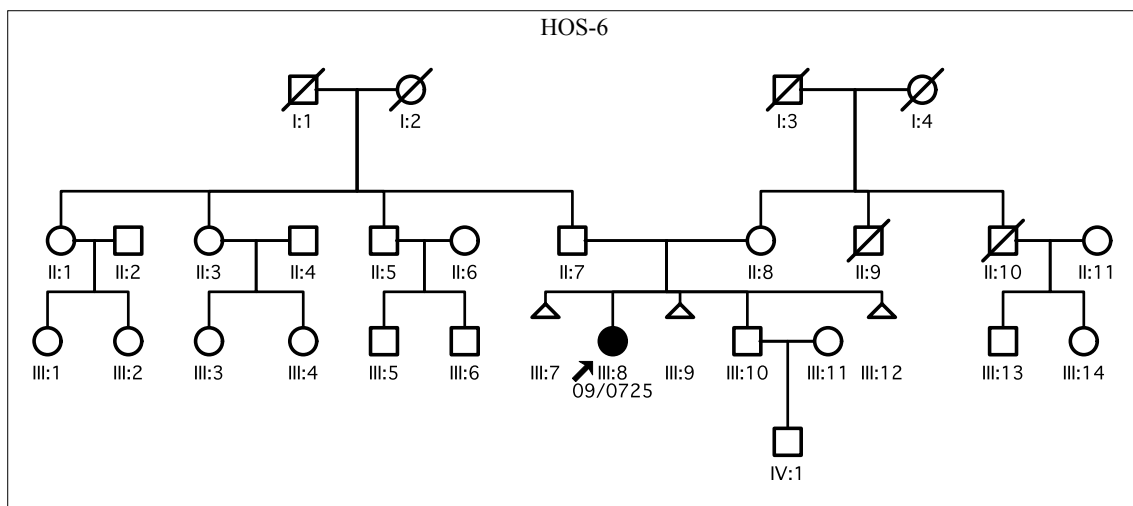
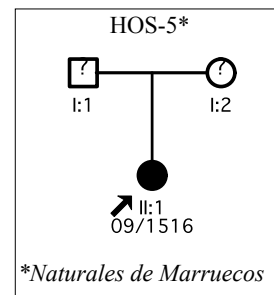
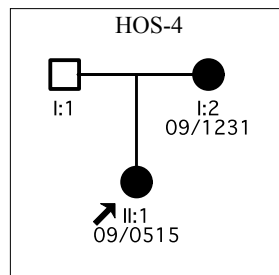
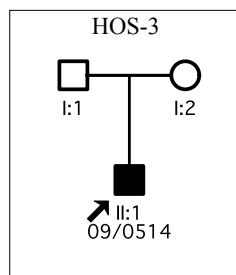
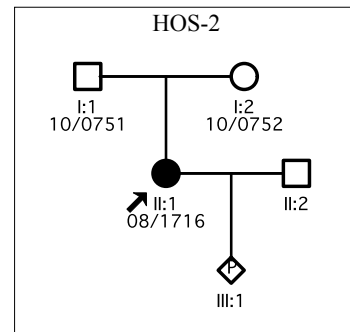
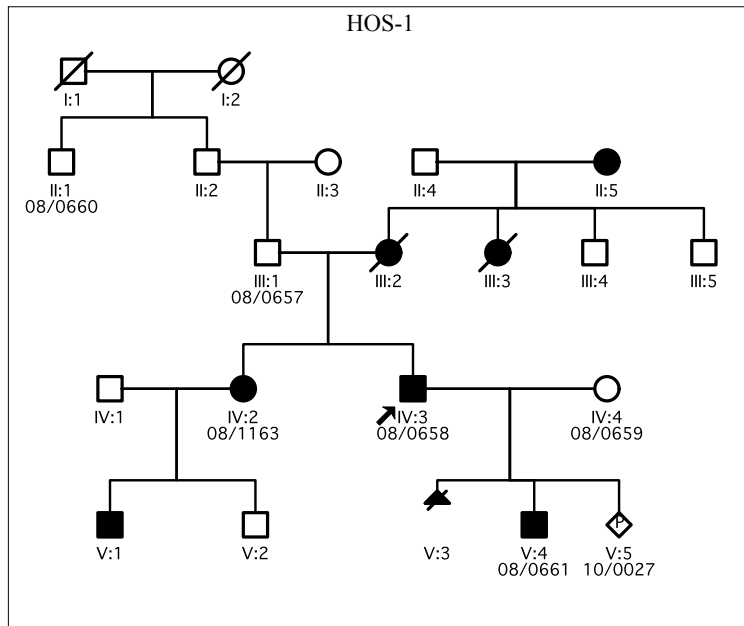
3.1.1.2.1.2.3 Familia con sospecha de displasia acromesomélica tipo Grebe

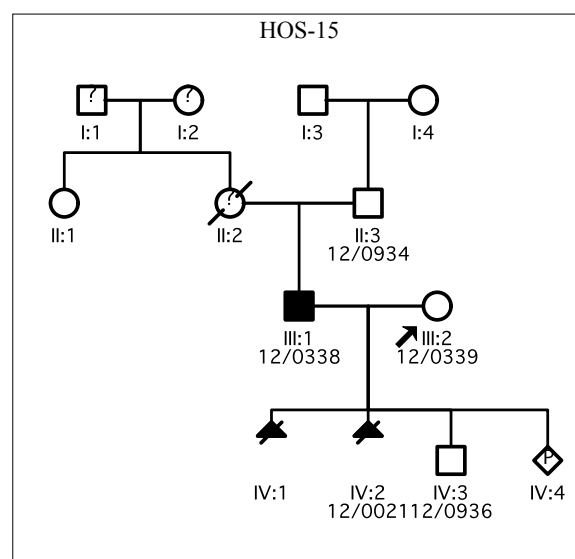
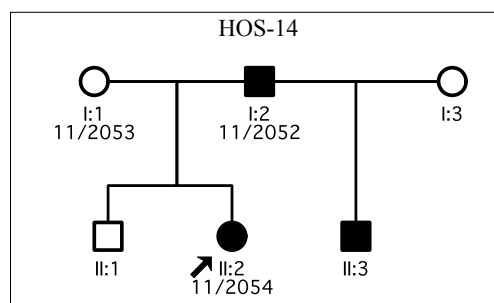
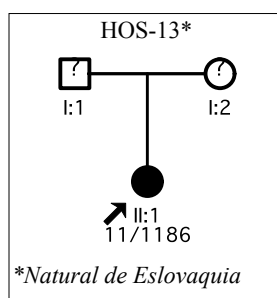
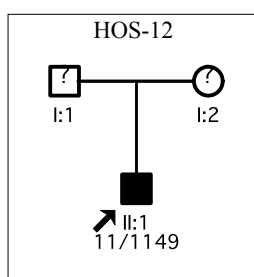
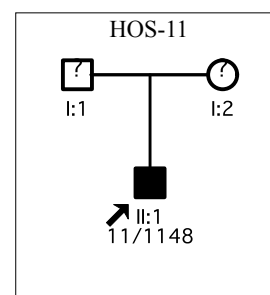
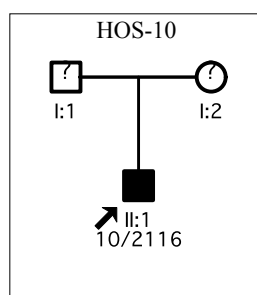
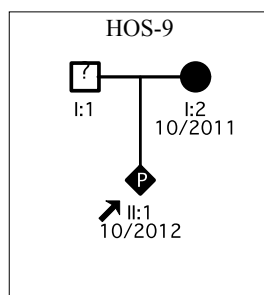
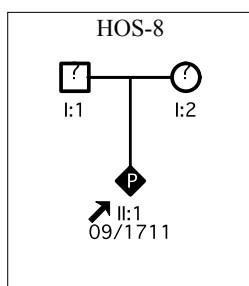
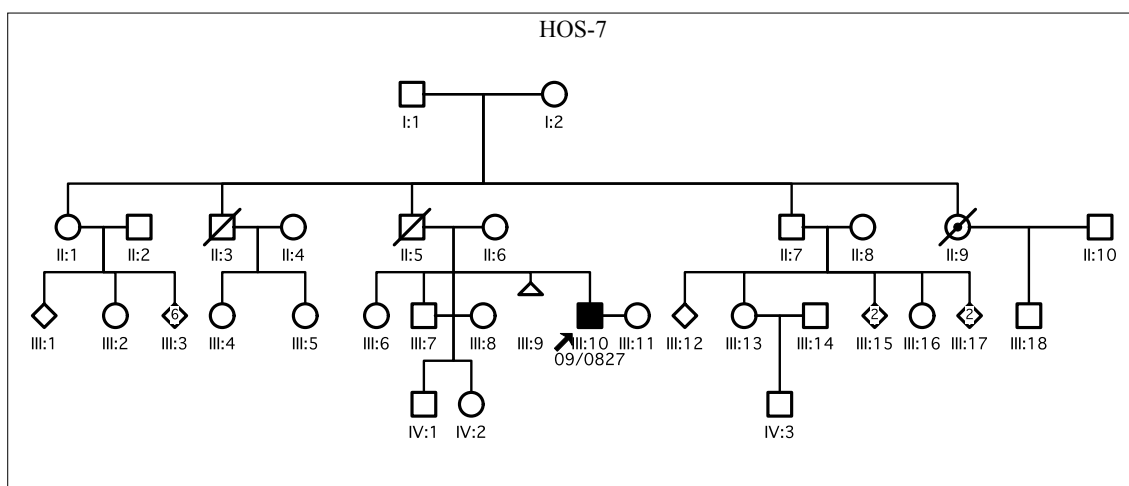


3.1.1.2.1.2.4 Familia con sospecha de Displasia Oculodentodigital

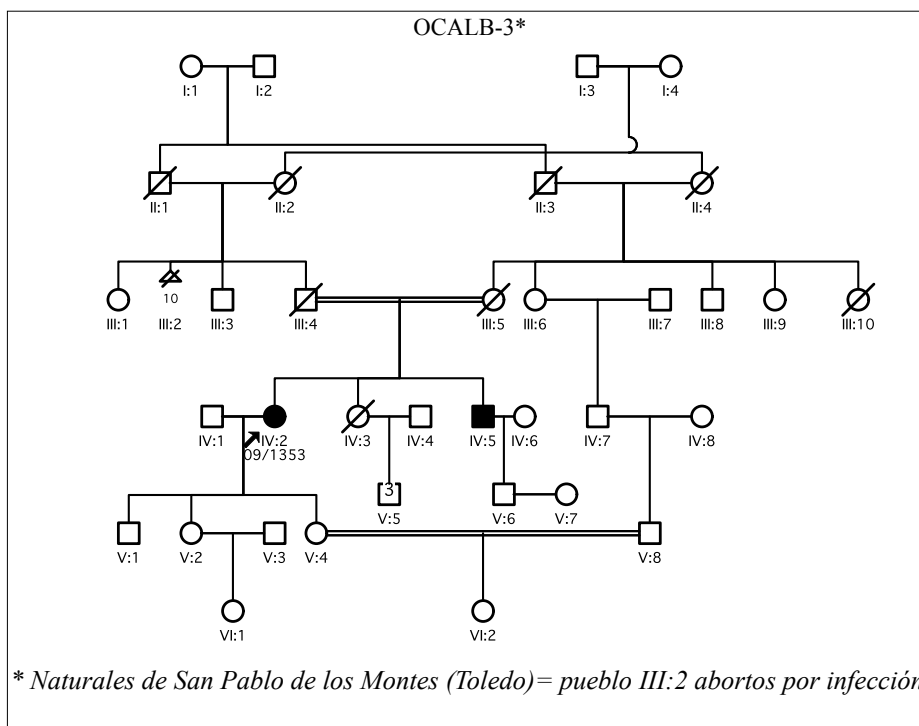
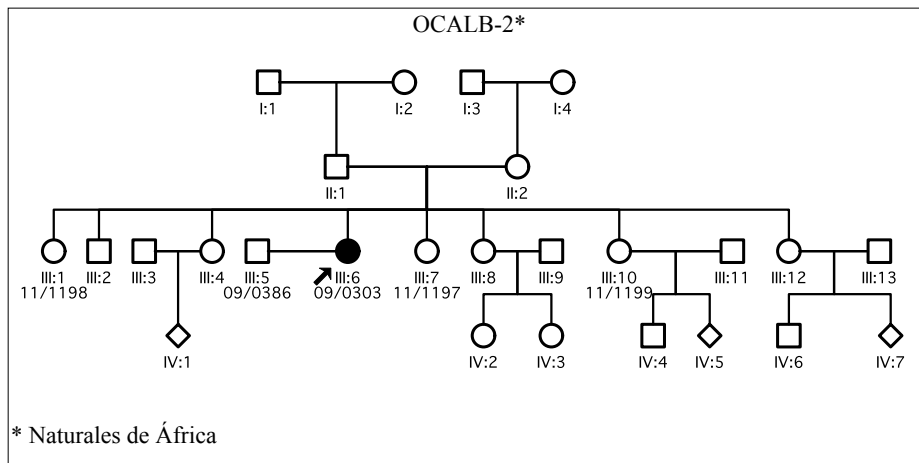
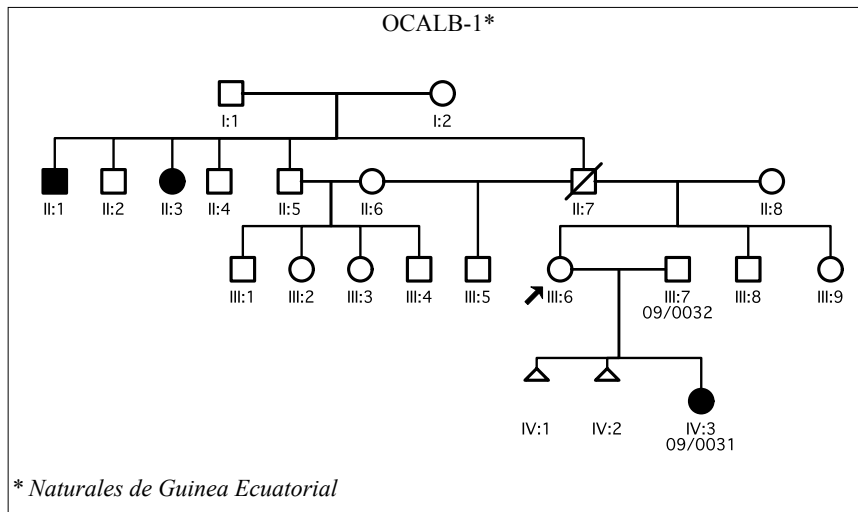


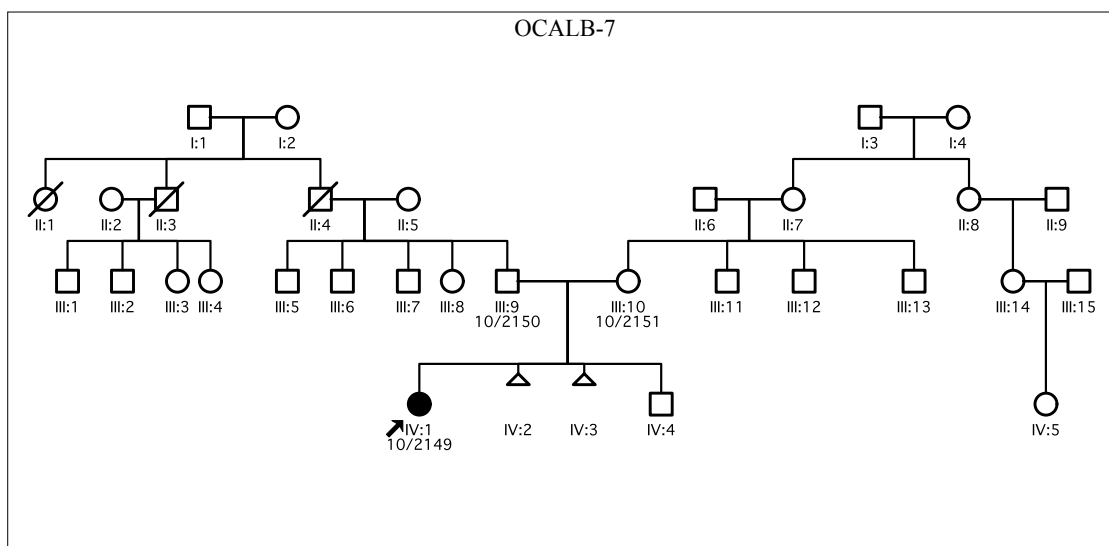
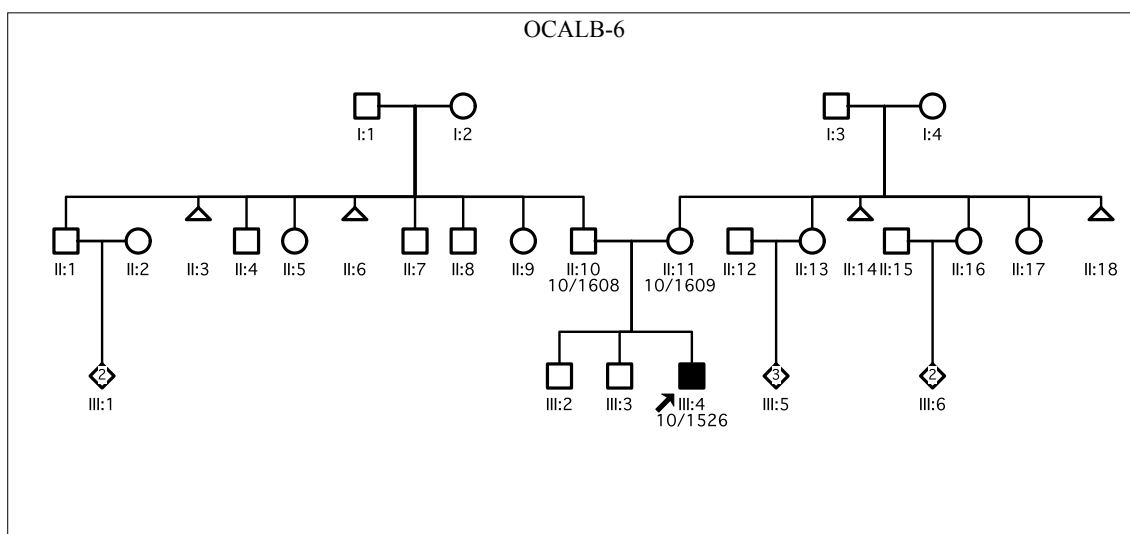
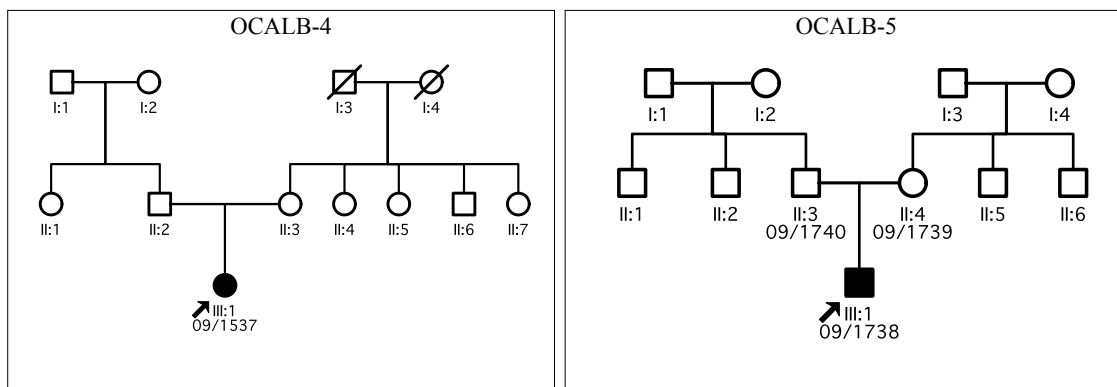
3.1.1.2.1.2.5 Familias con sospecha de Síndrome de Holt-Oram

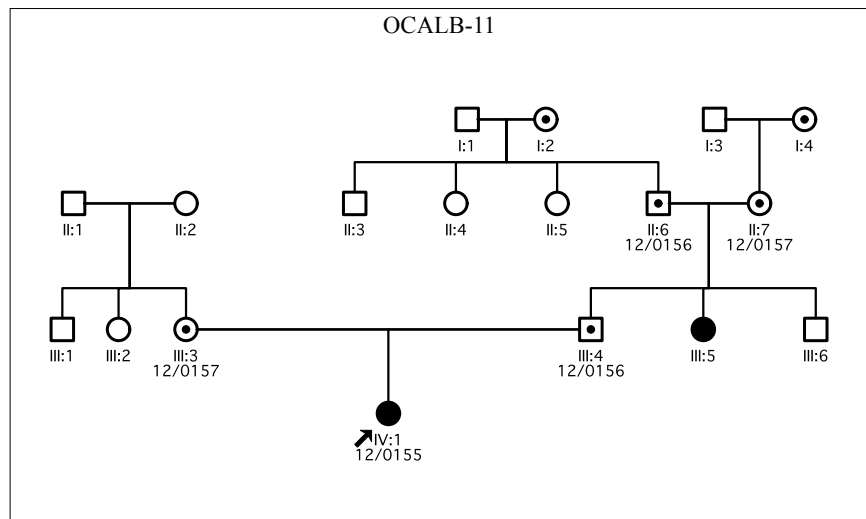
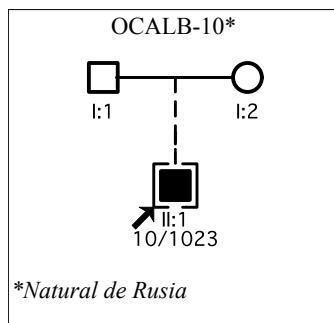
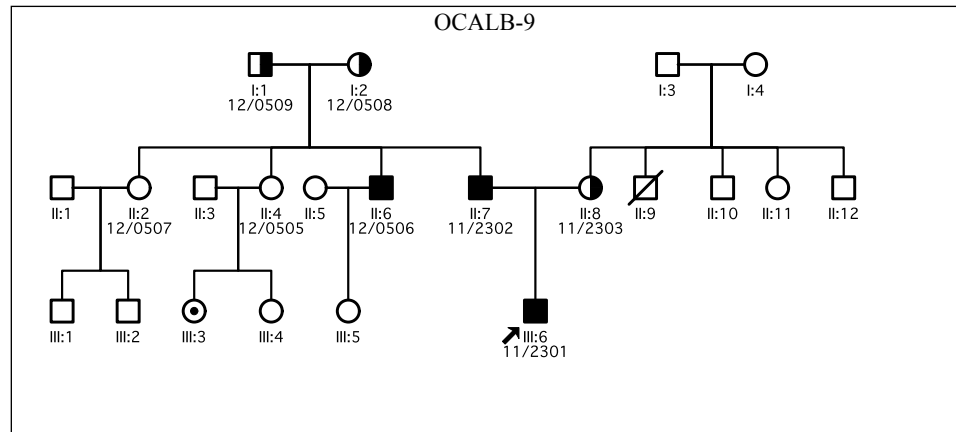
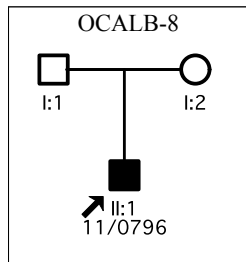




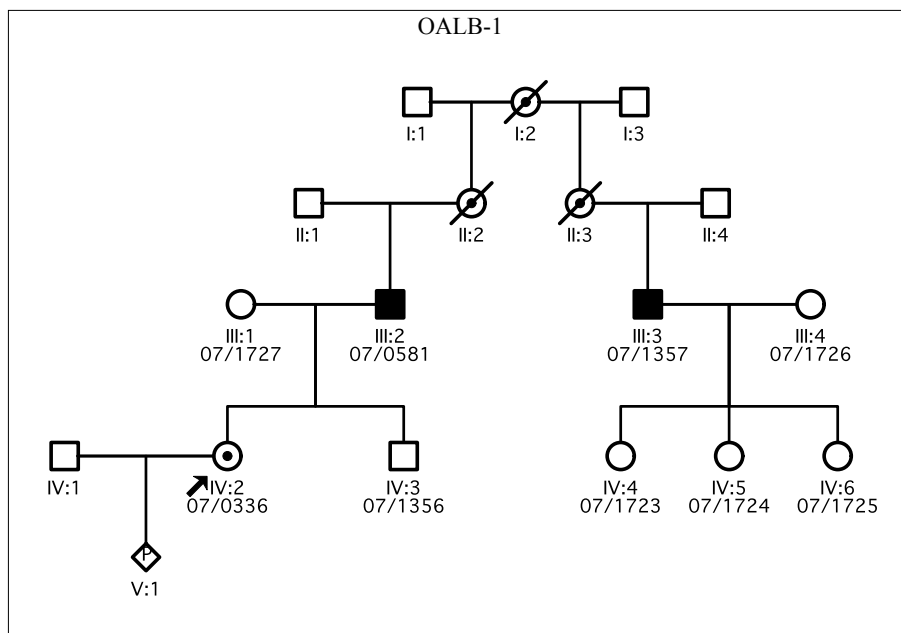
3.1.1.2.1.2.6 Familias con sospecha de Albinismo Oculocutáneo:

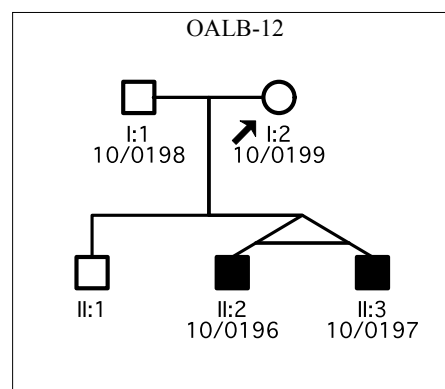
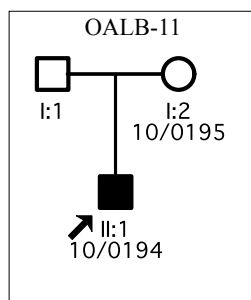
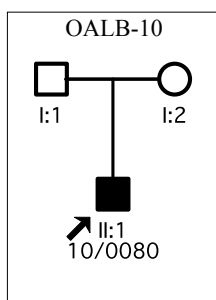
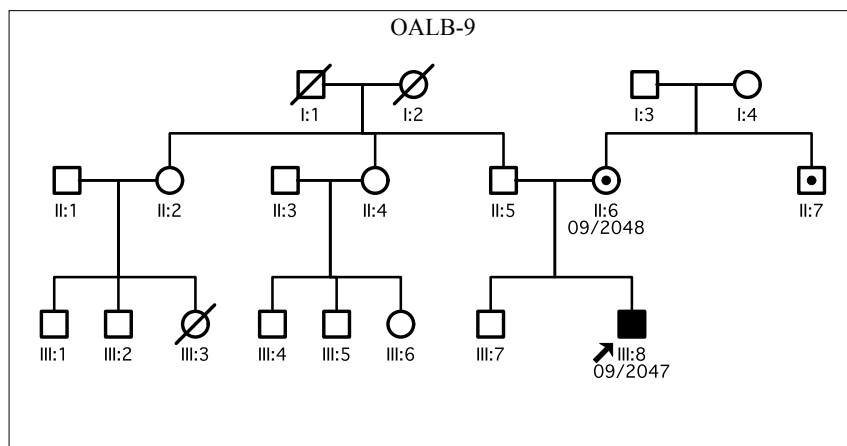
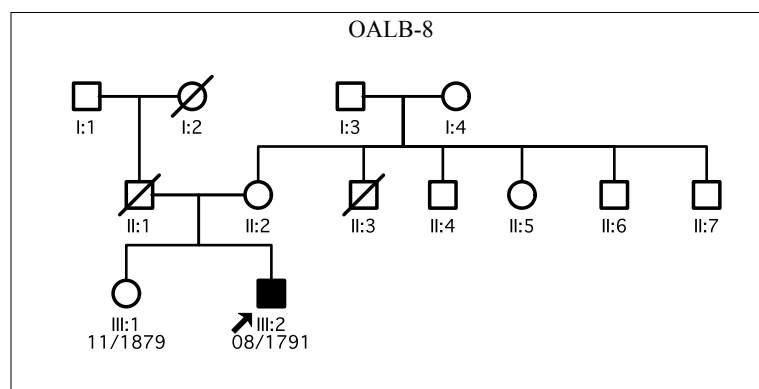
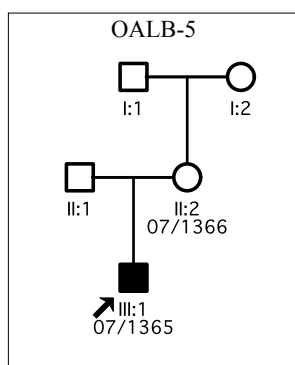
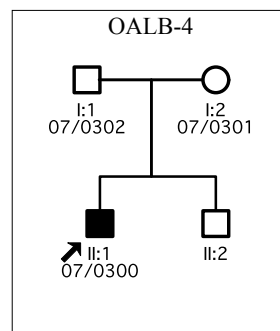
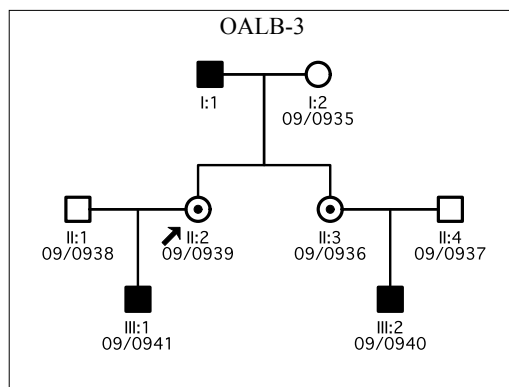
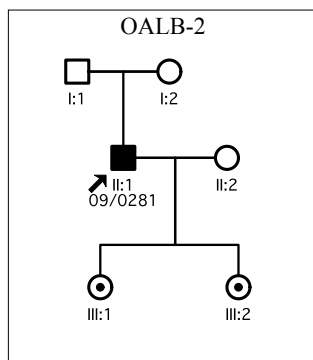


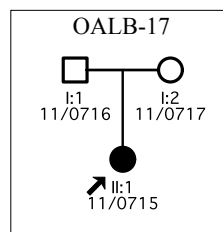
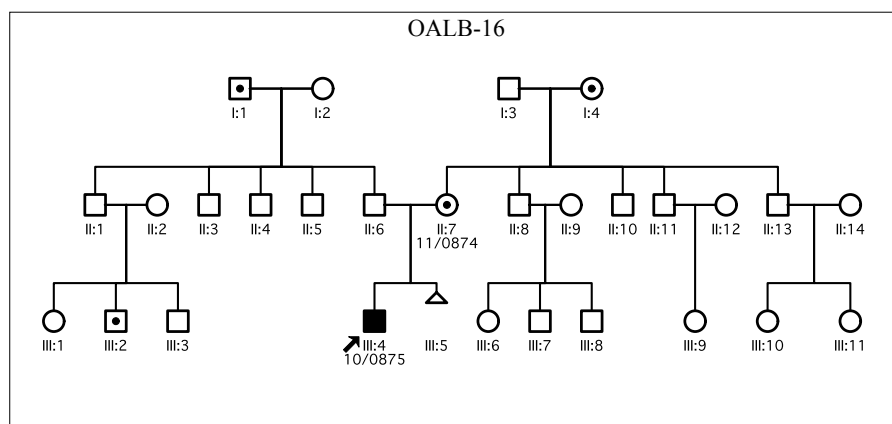
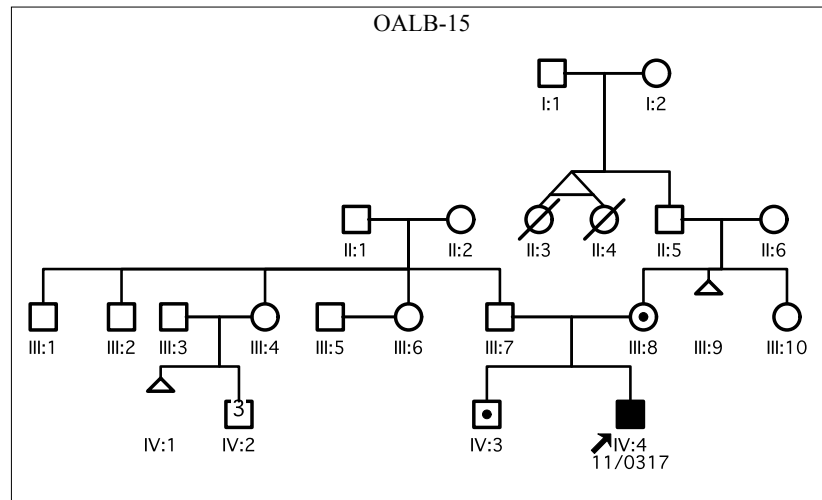




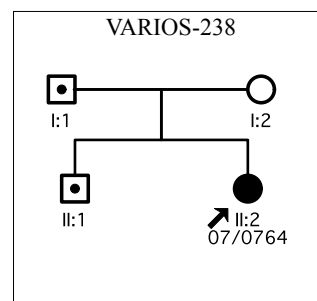
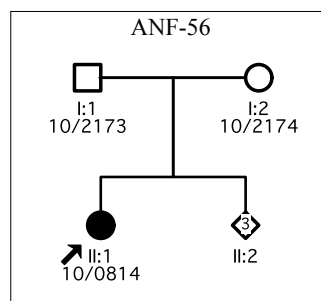
3.1.1.2.1.2.7 Familia con sospecha de Albinismo Ocular

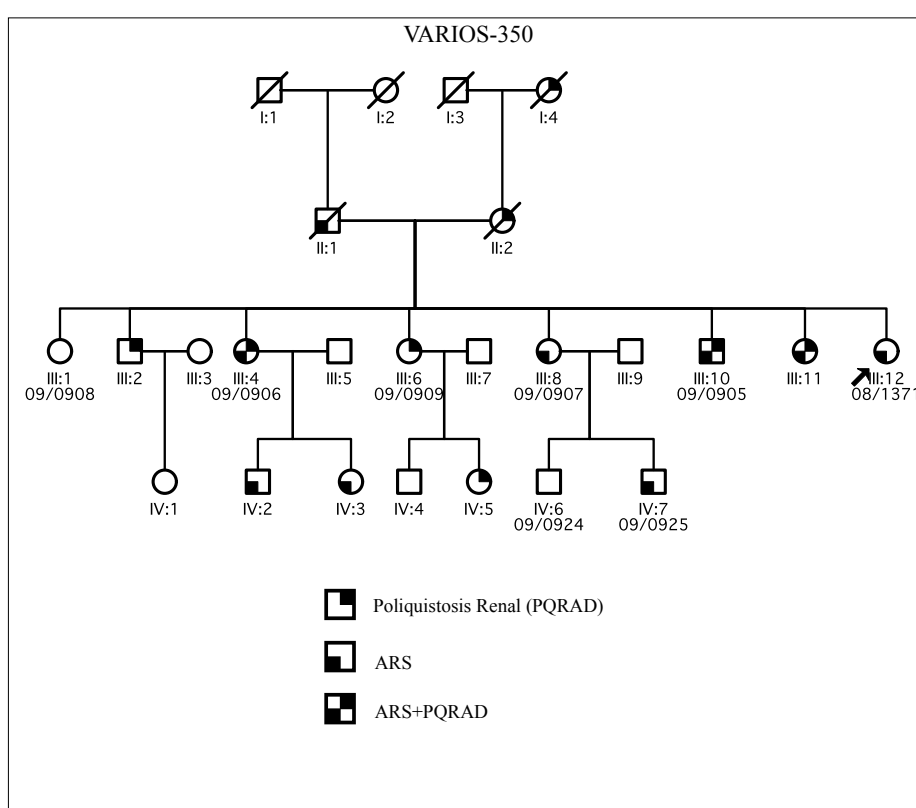
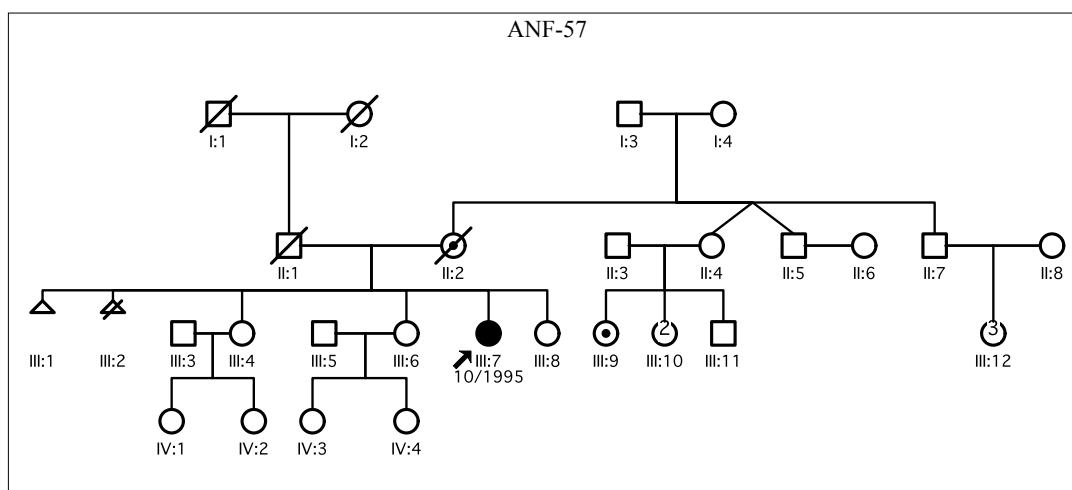






3.1.1.2.1.2.8 Familia con sospecha de Axenfeld Rieger





3.1.1.3. INDIVIDUOS CONTROL DE POBLACIÓN ESPAÑOLA

Se analizaron 100 cromosomas control procedentes de 50 donantes sanos de nacionalidad española, obtenidas de sangre periférica del Banco de Sangre de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, para determinar la frecuencia de las mutaciones identificadas en los pacientes afectados de las patologías anteriormente descritas, que no estaban descritas previamente en la literatura.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

En los restos abortivos, se obtuvo muestra por duplicado, para analizarlas por estudios moleculares y citogenéticos de: 1) vellosidad corial o líquido amniótico o plasma materno durante el periodo prenatal, 2) tejido muscular fresco o embebido en parafina, tras la interrupción de la gestación. Además, se realizó el aislamiento y purificación de ADN para los estudios moleculares.

En cuanto a las familias, se obtuvieron cuatro tipos de muestras para su estudio molecular: células bucales, sangre periférica, saliva y/o linfocitos (esta última como preparación para un proceso posterior de diagnóstico genético preimplantacional). A partir de estas muestras se extrajo y purificó el ADN, mediante el protocolo correspondiente en cada caso.

3.2.1.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ESTUDIO CITOGENÉTICO

3.2.1.1.1 CULTIVO CELULAR PARA OBTENCIÓN DEL CARIOTIPO

-Se seleccionó líquido amniótico vellosidad corial, cordón umbilical o músculo en condiciones estériles.

-Se cultivó durante dos semanas, cambiando de medio, tripsinizando y cambiando las células a tubos nuevos para aumentar la proliferación celular incubando de nuevo a 37° C.

-Se añadió en uno de los tubos 0,4 ml de KaryoMAX Colcemid 100 µg/ml (GIBCO Invitrogen, CA, USA).

-Este tubo se incubó 2 h a 37° C y después se tripsinizó para continuar con el sacrificio, extensión sobre un portaobjetos para obtener las bandas G y así poder obtener el cariotipo.

3.2.1.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO MOLECULAR.

3.2.1.2.1 AISLAMIENTO DE ADN

Se utilizaron dos métodos automatizados para la extracción de ADN:

-Biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) empleando diferentes tarjetas y cartuchos que se especifican para cada caso.

-Biorobot MAGNA Pure Compact system (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) sustituyendo el sistema anterior a partir de las muestras recibidas desde el año 2009.

3.2.1.2.1.1 Aislamiento de ADN a partir de sangre periférica.

-Se extrajo 7 centímetros cúbicos de sangre periférica recogida en un tubo con el anticoagulante EDTA, del que se transfirieron 350 µl a un tubo truncado de 2 ml.

-Para el biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) se empleó la tarjeta “EZ1 DNA Blood Card” y el cartucho desechable de reactivos “EZ1 DNA Blood Reagent Cartridges 350 µl kit”.

3.2.1.2.1.2 Aislamiento de ADN a partir de células bucales.

-Se recogieron las células bucales de la parte interior de las mejillas con una escobilla Buccal Swab Brushes, (Epicentre).

-Se añadieron 190 µl de tampón G2 (Qiagen, Hilden, Alemania) y 10 µl de proteinasa K.

-Se homogeneizó vigorosamente y se incubó en la estufa a 56° C durante toda la noche (o hasta que se hubo digerido todo el tejido adquiriendo una apariencia translúcida).

-Se transfirió los 200 µl de muestra digerida a un tubo truncado de 2 ml.

-Para el biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) se empleó la tarjeta “EZ1 DNA Tissue Card” y los cartuchos de reactivos específicos de tejido “EZ1 DNA Tissue Reagent Cartridges kit”, eluyendo las muestras en 100 µl .

3.2.1.2.1.3 Aislamiento de ADN a partir de saliva almacenada en el salivero Oragene

-Se mezcló la muestra de saliva con el reactivo OrageneDNA (DNA GenoTek), localizada a su vez en el salivero, mediante inversión y agitación suave, durante unos pocos segundos.

-Posteriormente, se trasvasaron 500 µL de la muestra a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se incubaron a 50 °C en un baño termostatzado, por un mínimo de 1 hora o en un horno incubador, por un mínimo de 2 horas.

-A continuación, se añadieron 20 µL de “Oragene DNA Purifier” (OG-L2P) y se dejó enfriar 10 minutos en hielo. Después, se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13.000 rpm.

-Tras la centrifugación, se transfirió el sobrenadante con una micropipeta a un nuevo tubo de 1,5 mL y se añadió, por cada 500 µL de sobrenadante, 500 µL de etanol al 95%-100% a temperatura ambiente y se mezcló suavemente 10 veces por inversión. Se dejó reposar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 minutos a 13.000 rpm.

-Después, se desechó el sobrenadante con una micropipeta y se añadió sobre el pellet, 250 µL de etanol al 70%, tras lo cual, se dejó reposar a temperatura ambiente 1 minuto.

-Finalmente, se eliminó el etanol y se añadió 100 µL de tampón TE para resuspender el pellet y se homogeneizó mediante vórtex durante al menos 5 segundos.

3.2.1.2.1.4 Aislamiento de ADN a partir de tejido muscular.

-Se partió de aproximadamente 10-25 mg de tejido muscular fetal.El material se disgregó mecánicamente mediante bisturí y pinzas esterilizadas en una placa Petri.

-Se lavó el material añadiendo 20 µl de suero fisiológico (NaCl 0.9%) al material disgregado.

-Se transfirió el material a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se completó con suero fisiológico (NaCl 0.9%).Posteriormente, se centrifugó 1 minuto a 8.000 rpm. Tras lo cual, se decantó el sobrenadante.

-Se repitieron 3 veces, los lavados especificados en los dos pasos anteriores.

-Tras decantar el sobrenadante, se añadió 10 µl de proteinasa K y 190 µl de Buffer G2 (Qiagen, Hilden, Alemania).

-Se homogeneizó y se incubó en la estufa a 56° C durante toda la noche (o hasta que se hubo digerido todo el tejido adquiriendo una apariencia translúcida).

-Se transfirieron 200 µl de muestra digerida a tubo truncado de 2 ml.

-Para el biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) se empleó la tarjeta “EZ1 DNA Tissue Card” y los cartuchos de reactivos específicos de tejido “EZ1 DNA Tissue Reagent Cartridges kit”, eluyendo las muestras en 100 µl .

3.2.1.2.1.5 Aislamiento de ADN genómico a partir de secciones de tejido parafinado

-Se realizaron cortes de 5-10 µ con el microtomo y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5ml, donde se añadió 1ml de xilol y posteriormente, se homogeneizaron vigorosamente las muestras, durante 10 segundos en un vórtex.

-A continuación, se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos a T^a ambiente. Tras lo cual, se desechó el sobrenadante con una pipeta. Se repitió este paso, una vez.

-Después, se añadió 1ml de etanol (100%) y se mezcló con un vórtex.

-Ulteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos a T^a ambiente, tras lo cual, se eliminó el sobrenadante con una pipeta fina y se incubó a T^a ambiente para evaporar el etanol residual.

-A continuación, se resuspendió el pellet en 180 µl de buffer ATL (Qiagen, Hilden, Alemania), se añadió 20 µl de proteinasa K y se incubó a 56°C durante 1h. Posteriormente, se llevó a un termobloque a 90°C una hora.

-Finalmente, se purificó el ADN mediante el biorobot QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemania) con el protocolo QIAmp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania).

3.2.1.2.1.6 Aislamiento de ADN a partir de vellosidad corial (VC) obtenido mediante biopsia (BC).

-Se transfirió la vellosidad corial a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se troceó. A continuación, se añadió 750 µl de suero fisiológico (NaCl 0.9%) para su lavado, se homogeneizó y se retiró el sobrenadante con pipeta Pasteur. Este paso se repitió dos veces.

-Se añadió 10 µl de proteinasa K y 190 µl de Buffer G2 (Qiagen, Hilden, Alemania).

-Se homogeneizó vigorosamente y se incubó en la estufa a 56° C durante toda la noche (o bien, hasta que se hubo digerido todo el tejido, apariencia translúcida).

-Se transfirieron 200 µl de muestra digerida a tubo truncado de 2 ml.

-Para el biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) se empleó la tarjeta “EZ1 DNA Tissue Card” y los cartuchos de reactivos específicos de tejido “EZ1 DNA Tissue Reagent Cartridges kit”, eluyendo las muestras en 100 µl .

3.2.1.2.1.7 Aislamiento de ADN a partir de líquido amniótico (LA).

-Se transfirió 1,5 ml de líquido amniótico a un tubo truncado de 2 ml y se centrifugó 10 minutos a 14.000 rpm. Después, se decantó el sobrenadante y se añadió al tubo truncado 190 µl del tampón Buffer G2 (Qiagen, Hilden, Alemania) y 10 µl de Proteinasa K.

-Se incubó durante 15 minutos a 56° C en la estufa.

-Para el biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) se empleó la tarjeta denominada “DNA forensic Card” y los cartuchos de reactivos de tejido “Forensic 350 µl Reagent Cartridges”.

3.2.1.2.1.8 Aislamiento de ADN fetal a partir de plasma materno

- Se extrajo 2 tubos de 10 cc cada uno de sangre periférica de la gestante con EDTA en dos tandas:

- 1ª Muestra se recogió en torno a la 7ª semana de gestación.

- 2ª Muestra fue obtenida alrededor de la 9ª semana de gestación.

- Posteriormente, se obtuvo el plasma materno en las 24 horas siguientes a la extracción de sangre periférica de gestante, mediante los siguientes pasos.
- Se centrifugaron los tubos de sangre con EDTA a 1600 rpm durante 10 minutos para la obtención del plasma.
- En campana estéril, el plasma obtenido por cada tubo, es transferido a varios Eppendorf de 1,5 ml. A continuación, se centrifugaron dichos tubos Eppendorf a 14000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Se extrajo el ADN presente en el plasma materno (ADN fetal y ADN materno) automáticamente mediante el robot QIAcube (QIAGEN, Hilden, Alemania) empleando las columnas QIAamp DNA Blood Mini Kit.

3.2.1.2.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN

- Una vez aislado el ADN de las muestras, se procedió a su cuantificación mediante el empleo del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.1.2.3 AISLAMIENTO DE LINFOCITOS

- Se añadieron 3 ml de gradiente de densidad Histopaque 1077 atemperado en un Falcon de 15 ml y se dejó caer lentamente 3 ml de sangre periférica sobre el Histopaque.
- Se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos sin freno y se decantó el plasma cuidadosamente.
- Se recogió la interfase con pipeta Pasteur y se transfirió a un nuevo tubo Falcon de 15 ml.
- Se añadió 6 ml de PBS, se centrifugó 1500 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Este paso se repitió 3 veces.
- Se añadió 1 ml de PBS resuspendiendo el botón celular.
- Se seleccionó los linfocitos a través del microscopio invertido (Nikon Phase contrast ELWD0.3) y se entubaron en tubos de 0.2 ml que contenían 2.5 µl de tampón de lisis ALB (200mM NaOH + 50mM DTT)

3.2.2 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

3.2.2.1. CARIOTIPO

-Se obtuvo el cariotipo observando 15 metafases contadas a microscopía óptica y fotografiadas mediante el sistema de captura de imágenes Quips CGH/Karyotyper, en aquellos casos en los que el cultivo progresó adecuadamente.

3.2.3 TÉCNICAS MOLECULARES: ANÁLISIS DIRECTOS

3.2.3.1. MLPA: Amplificación en multiplex de sondas dependientes de ligación

La técnica de amplificación en multiplex de sondas dependientes de ligación (MLPA), descrita por primera vez en 2002 (Schouten et al., 2002), se utilizó para la detección de grandes deleciones y duplicaciones tanto en las familias como en los abortos, aplicando las sondas correspondientes a cada sospecha clínica. Cada sonda consiste en dos oligos que hibridan adyacentemente al genómico.

El oligo hibridado en la región 5' (en la figura denominado como Oligo 1) consta de una región complementaria universal a uno de los cebadores (marcado en verde) y una región que hibrida con el genómico (marcado en azul). El otro oligo (en la figura denominado como Oligo 2) hibrida adyacentemente, (separado del primero por un enlace) y consta de una región complementaria al genómico (marcada en azul), una región no complementaria al genómico (marcada en negro) y una región complementaria universal al otro cebador (marcada en verde) (*figura 3.1*).

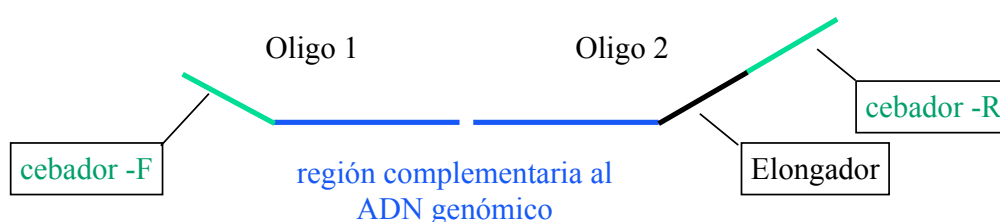


Figura 3.1. Representación gráfica de una sonda de MLPA.

3.2.3.1.1 Empleo de Kits comerciales

En este estudio, se han empleado kits comerciales de MLPA (MRC-Holland) para el análisis de muestras con sospecha clínica de distintas anomalías cardíacas, craneofaciales esqueléticas, y oculares. Los kits empleados se detallan a continuación, así como, sus respectivas regiones de hibridación y la aplicación de las mismas (*tabla 3.3*).

SALSAs de MLPA (MRC-Holland)	REGIONES DE HIBRIDACIÓN	APLICACIÓN
<i>SALSAs p029</i>	<i>ELN, CLIP2, FZD9, TBL2, STX1A, LIMK1, RFC2, FKBP6.</i>	Síndrome de Williams-Beuren
<i>SALSAs p036 y p070</i>	<i>Regiones subteloméricas de cromosomas</i>	<i>Alteración de las regiones subteloméricas</i>
<i>SALSA p054</i>	<i>TWIST1, FOXL2, FOXC1, FOXC2, ATR, PITX2, GPR143</i>	Enfermedades oftalmogénéticas
<i>SALSA p065 y p066</i>	<i>FBN1, TGFR2, DUT</i>	Síndrome de Marfan
<i>SALSA p080</i>	<i>FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, MSX2, ALX1, ALX3, ALX4, EFNBI, RUNX2</i>	Anomalías craneofaciales
<i>SALSA p179</i>	<i>GLI3, HOXD13, ROR2</i>	Anomalías de extremidades
<i>SALSA p180</i>	<i>SALL1, SALL4, TBX5.</i>	Anomalías de extremidades y cardíacas
<i>SALSA p187</i>	<i>SHH, ZIC2, SIX3, TGIF, TMEM1, GLI2, PTCH, FBXW11</i>	Holoprosencefalia
<i>SALSA p245</i>	<i>Regiones involucradas en síndromes de microdeleción</i>	Síndrome de microdeleción
<i>SALSA p250</i>	<i>Región 22q11 crítica del síndrome de deleción 22q11</i>	Síndrome de deleción 22q11
<i>SALSA p325</i>	<i>TYR, OCA2</i>	Albinismo Oculocutáneo

Tabla 3.3. Kits (SALSAs) de MLPA empleados en el estudio.

El protocolo de esta técnica, se optimizó para las condiciones del laboratorio del área de genética y genómica del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz. El protocolo constó de 4 fases que se detalla a continuación: a) Desnaturalización de ADN genómico e hibridación de las sondas; b) Ligación de las sondas; c) Reacción de PCR de las sondas. d) Separación de fragmentos e interpretación de los resultados (*figura 3.2*).

a) Desnaturalización del ADN genómico e hibridación de las sondas.

-Se diluyó 1.5 µl de ADN con una concentración inicial de 50 ng/µl en 3.5 µl de agua esterilizada en tubos Eppendorf de 0.2 ml. Se desnaturalizó en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA), a una temperatura de 98° C durante 5 minutos y después, se atemperó a 25° C durante 5 minutos.

-Se añadió homogeneizando, 3 µl de la mezcla que contenía: 1.5 µl de salsa de sondas y 1.5 µl de buffer por muestra.

-Se procedió a la hibridación de las sondas al ADN genómico, elevando la temperatura a 95°C durante 1 minuto, e incubando las muestras a 60° C durante 16 horas en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA).

b) Ligación de las oligos.

-Se cambió la temperatura del termociclador a 54° C y se añadió 32µl de la mezcla de la ligación, que constó en 3 µl de ligasa 65 buffer A, 3 µl de buffer 65, 1 de ligasa 65, 25 µl de agua destilada por cada tubo.

-Se mantuvo 5 minutos a 54° C con la mezcla de ligación añadida y después, se elevó la temperatura a 98° C durante 5 minutos. Inmediatamente después, se enfriaron las muestras a 4° C durante 20 minutos.

- Se transfirió 10 µl de producto de ligación a tubos nuevos de Eppendorf de 0.2 ml, guardando los 30 µl restantes a una temperatura de 4°C, para posteriores usos.

c) Reacción en cadena de reacción de la polimerasa (PCR) de las sondas.

-Se preparó la mezcla de reacción de PCR, en el que se incluyó 4 µl de salsa PCR buffer, 31.5 µl de agua destilada, 2 µl de buffer y 2 µl de buffer y 0.5 µl de polimerasa, por cada tubo.

-Se añadió homogeneizando, 40 µl de mezcla a los tubos que contenían 10 µl de producto de ligación.

-Las condiciones del termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA) para la PCR fueron las siguientes: 37 ciclos de 95° C durante 45 segundos; 60° C 45 segundos y 72° C 1 minuto 30 segundos y posteriormente, se añadió un paso de 7 minutos 72° C y se enfriaron las muestras a 4° C.

d) Separación de fragmentos e interpretación de los resultados.

-A partir del producto final de cada tubo, se obtuvieron 1.5 µl y se colocaron en una placa de 96 pocillos Micro Amp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

-Se preparó una mezcla con 8.5 µl de formamida ultra pura y 0.5 µl de marcador de peso molecular (Gene Scan 500 LIZ Standard), por cada tubo.

-Se repartió homogeneizando, 9 µl de la mezcla a cada muestra.

-Finalmente, se sometió a electroforesis capilar en el ABI PRISM® 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los electroferogramas resultantes de la aplicación de esta técnica en las muestras, fueron comparados con electroferogramas de pacientes controles. La disminución o aumento en un 35-50% del área del amplificado, contrastado con dicho amplificado en un paciente control, se consideró deleción y duplicación respectivamente, en heterocigosis de la sonda correspondiente a dicho amplificado. El análisis y normalización de los resultados fue llevado a cabo mediante el programa informático Coffalyzer (MRC-Holland).

A finales del año 2010, la casa comercial MRC Holland modificó los reactivos implicados en el paso de la PCR y como consecuencia el protocolo. El protocolo en la hibridación y ligación son iguales al protocolo anterior. Sin embargo, en la PCR, se prepara un coctel de 7,5 µl de Agua, 2 µl de la mezcla de cebadores y 0.5 µl de polimerasa por cada tubo y se reparten 10 µl sobre los 32 µl de producto de ligación.

MLPA: 0

Fecha:

1:			
2:			
3:			
4:			
5:			
6:			
7:			
8:			
9:			
10:			

Nº Muestras: 0

Nº de Placa:

Usuario:

Enfermedad:

SALSA:

1Dia SALSA HIBRIDACION

1.5 ul de ADN + 3.5ul de agua esteril

Hibridación MIX

1.5ul SALSA probe-MIX (tapon negro)

1.5ul Buffer MLPA (Tapon amarillo)

1.5

1.5

3ul

98° 5'

25° 5'

95° 1'

60° 16 horas

vf=8ul

Añadir 3ul de I mix a cada tubo

2Dia Ligase

Ligase MIX:

3ul Ligasa Buffer A(tapon transparente)

3ul Ligasa Buffer B (tapon blanco)

25ul Agua

1ul Ligasa (tapon marron)

3

3

25

1

32ul

54° 5'

98° 5'

vf=40ul

10ul

Añadir 32ul del mix a cada tubo

2Dia PCR

PCR MIX

2ul Salsa PCR-Primers (tapon morado)

2ul dilution buffer (tapon azul)

31.5ul agua

0.5ul Polymerase (tapon naranja)

4ul buffer(tapon rojo)

2

2

31.5

0.5

4

40ul

95° 45''

60° 45''

72° 1'30''

4° 8

37ciclos

vf=50ul

Añadir 40ul del mix a cada tubo

NOTAS:

Figura 3.2. Plantilla de la técnica MLPA donde en la tabla plasmada en la parte superior de la figura se clasifican las muestras. En la parte inferior se detallan los reactivos, y cantidades en μ l que se deben añadir por muestra.

- 92 -

3.2.3.1.2 Diseño de sondas para MLPA

Se realizó un diseño de sondas para abarcar conjuntamente el análisis mediante MLPA de los genes *BMP4*, *OTX2* y *SOX2* (tabla 3.4) relacionados con el desarrollo ocular, para analizar pacientes con sospecha clínica de Axenfeld-Rieger. Para lo cual, se siguieron las recomendaciones de MRC-Holland. Mediante el programa informático Raw se comprobó las temperaturas de melting y la concentración de guaninas y citosinas.

SONDA	Oligos	Fluorocromo	Secuencia del oligo	Tm oligos	% G/C oligos	Tm sonda	% G/C sonda
<i>BMP4</i> _Exón3	Oligo 1	6-FAM	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CGCAGCCTAGCAAGAGTGC CGTCAT -3'	76.51°	60%	91.52°	58%
	Oligo 2	-	5'-TCCGGACTACATGCGGGAT CTTTACCGCTTCAGCTCTTA ACTAGATCTTCGAGTAC TCTAGATTGGATCTTGCTGG CAC -3'	81.41°	56%		
<i>BMP4</i> _Exón4	Oligo 1	6-FAM	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CAACTCAACCAACCATGCC ATTGTGCAG -3'	76.55°	50%	88.69°	48%
	Oligo 2	-	5'-ACCCTGGTCAATTCTGTCAA TTCCAGTATCCCTGCGAATCAG TCTAGATTGGAATCTTGCTGGCAC -3'	75.26°	47%		
<i>OTX2</i> _Exón1	Oligo 1	6-FAM	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GGGCCGACTTTGCACCTCCAAA CAACCTT -3'	79.79°	55%	87.70°	50%
	Oligo 2	-	5'-AGCATGATGTCTTATCTTA AGCAACCGCCCGCTTAGTCA GGCATTCTAGATTGGATC TTGCTGGCAC -3'	71.41°	45%		
<i>OTX2</i> _Exón2	Oligo 1	6-FAM	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CTAGATGTGCTGGAAGCACTG TTTGCCA -3'	74.83°	50%	89.81°	53%
	Oligo 2	-	5'-AGACCCGGTACCCAGACA TCTTCATGTCAAGTATCAGT GGCGACCTCGATATCTAGA TTGGATCTTGCTGGCAC -3'	72.85°	54%		
<i>OTX2</i> _Exón3	Oligo 1	6-FAM	5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GGGAAGTGAGTTCAGAGAGT GGAACAAG -3'	72.82°	50%	90.55°	55%
	Oligo 2	-	5'-TGGCCAATTCACCTCCCCCT CTAGCACCTCAGGATCTAGATT GGATCTTGCTGGCAC -3'	82.01°	59%		

Tabla 3.4. Secuencias de las sondas de MLPA diseñadas para las regiones codificantes de los genes: *OTX2*, *SOX2*, *BMP4*. En verde se muestra la secuencia de los cebadores universales idéntica a todas los fragmentos. En azul se muestra la región de hibridación al ADN genómico específica para cada región. En negro se muestra la secuencia elongadora.

El rango de concentración de guaninas y citosinas para el oligo 1 se estableció entre 40-60%, mientras que para el oligo 2, entre 35-60%. Además la temperatura de *melting* fue superior a 70°C y la longitud de la secuencia hibridante fue aproximadamente, para todos los exones de 42 nucleótidos. La secuencia del elongador se diseñó específicamente, para cada caso, añadiendo nucleótidos no complementarios a la región contigua a la región de hibridación de la sonda, con el fin de que el amplicón de cada sonda tenga un tamaño de al menos 4pb de diferencia con respecto al resto de los amplicones. En el caso del gen *SOX2* se emplearon las sondas previamente descritas (Bakrania et al., 2007).

3.2.3.2 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

El estudio directo de los genes responsables de las patologías previamente citadas se realizó mediante amplificación de las regiones de interés, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Kary Mullis de Cetus Corporation en 1985 (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Los fragmentos que se emplearon en este estudio para posterior secuenciación, se listan a continuación. Los experimentos se llevaron a cabo en dos formas distintas: en tubos simples de 0.2 ml o en placas de 96 pocillos [Micro Amp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)].

3.2.3.2.1 Gen *TBX1* (asociado al síndrome de delección 22q11)

Los cebadores empleados para amplificar la región codificante de este gen fueron publicados previamente, sin embargo las condiciones fueron ajustadas a los requerimientos de nuestro laboratorio. En la siguiente tabla (*tabla 3.5*) se muestran las secuencias de los cebadores en dirección (5'-3') y las temperaturas de hibridación de los mismos específicas para cada región (Zweier et al., 2007). Este gen fue analizado en individuos con sospecha clínica de síndrome de delección 22q11 que no presentaban la delección genómica, y en restos abortivos que fueron referidos con la indicación clínica de cardiopatía .

Las condiciones de amplificación de los diferentes fragmentos se muestran a continuación (*tabla 3.6*):

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	<i>Touch Down Degree</i> (Td)	Temperatura de hibridación (Th)
<i>TBX1</i> -ex1	GAGCAGATGTCTCAGCCCAG	CCACACTCTCTTCACCTGC	64°C(-1°C/ciclo)	60°C
<i>TBX1</i> -ex2	CTGTCTCCCCGAGCCAGT	CAAGAGTGCTCCACCTAC	64°C(-1°C/ciclo)	60°C
<i>TBX1</i> -ex3	GCAGTCTCGCATTCTGC	GGCGGAGGATAGGTGTAGGAG	-	60°C
<i>TBX1</i> -ex4	GCTAAGCCAGGAAAGATGGAG	CGGGTTGATCGGGCAGCATCGC	-	60°C
<i>TBX1</i> -ex5	CAGAGGGTTCAATCTCACAGG	GGATTCTACAGGCCTCTTAGG	64°C(-1°C/ciclo)	60°C
<i>TBX1</i> -ex6	CATTGCCAACTCAGACCTCAG	CACAGCCTGCAGGTCTAAGC	64°C(-1°C/ciclo)	60°C
<i>TBX1</i> -ex7	CTTGTCAGGGCAGCAGAAAGG	TAGAGCGCGCACAGGGCC	64°C(-1°C/ciclo)	60°C
<i>TBX1</i> -ex8	CTTGTCAGGGCAGCAGAAAGG	GCGGAGAGAAGGCTCTTG	62°C(-0,4°C/ciclo)	60°C
<i>TBX1</i> -ex9a	TCAGACACTGGACATTTGTGC	ACTGGGAGTGTGACTCTATGGA	64°C(-1°C/ciclo)	60°C
<i>TBX1</i> -ex9b	AGGCCACAAACACTTTGACC	TTCCATCACAGCCTCTTCAC	-	60°C
<i>TBX1</i> -ex9c	GACTGGTCGGGGAACACC	AACGTATTCCTTGCTTGCCC	64°C(-1°C/ciclo)	60°C

Tabla 3.5. Secuencias de las oligos para amplificar el gen *TBX1* y las temperaturas de hibridación de los mismos. (Td y Th).

Condiciones de amplificación de los exones 1, 2, 5, 6, 7 y 9a del gen <i>TBX1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón sin MgCl ₂ (Roche)	10X	5 µl	95°C	5 min
MgCl ₂ (Roche)	2mM	3 µl	Td°C } 5x	20 s
dNTPs	1,25 mM	8 µl		20 s
Cebadores F/R	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl		40 s
DMSO (Merck)	10X	5 µl	95°C } 25x	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl		20 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0´5 µl		40 s
Agua estéril (Braun)			72°C	7 min
		25.5 µl	4°C	∞

Condiciones de amplificación del exón 3 del gen <i>TBX1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón sin MgCl ₂	10X	5 µl	95°C	5 min
MgCl ₂	2mM	3 µl	95°C	1 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	Th°C } 35x	
Cebadores F/R	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl		
DMSO (Merck)	10X	5 µl	72°C	45 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	1 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0´5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		25.5 µl	4°C	∞

Condiciones de amplificación del exón 4 y 9b del gen <i>TBX1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	1 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C } 35x	
ADN	50 ng/µl	1 µl		
DMSO (Merck)	10X	5 µl	72°C	45 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0´5 µl	72°C	1 min
Agua estéril (Braun)		28.5 µl	72°C	7 min
			4°C	∞

Tabla 3.6. Condiciones de amplificación de los diferentes fragmentos del gen *TBX1*. Th: Temperatura de hibridación. Td: Touch Down Degree (*continúa*).

Condiciones de amplificación de los exones 8 y 9c del gen <i>TBX1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón sin MgCl ₂	10X	5 µl	95°C	5 min
MgCl ₂	2mM	3 µl	95°C	1 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	Td°C	5x 1'30 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl	95°C	1 min
DMSO (Merck)	10X	5 µl	Th°C	25x 1'30 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	7 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	4°C	∞
Agua estéril (Braun)		25.5 µl		

Tabla 3.6 (continuación). Condiciones de amplificación de los diferentes fragmentos del gen *TBX1*. Th: Temperatura de hibridación. Td: Touch Down Degree.

3.2.3.2.2 Gen *PTPN11* (asociado al síndrome de Noonan)

Los cebadores para amplificar la región codificante del gen *PTPN11*, fueron diseñados mediante la herramienta informática de libre acceso In Silico-PCR de la Universidad de California Santa Clara (UCSC) (*tabla 3.7*). Este gen fue cribado en restos abortivos que manifestaban algún tipo de cardiopatía.

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>PTPN11</i> -ex1a	ATGAAATCGATGTGGCAGCG	TCCGCGATGTCATGTTCTC	60°C
<i>PTPN11</i> -ex1b	TCCAGGAGGAAGCAAGGATG	CTTCCGGACGGGGCTAAC	60°C
<i>PTPN11</i> -ex2	CCAAGGAGAAGAGGGGAAG	GAAATGCAGGCAGCAAGCTA	60°C
<i>PTPN11</i> -ex3	TATTTGTCCCTTGCCCTCC	GCAATTTCTGACACTCAGGGC	60°C
<i>PTPN11</i> -ex4	GTGGTTTTCTGCCTGCAT	GGTAACATCTTGCCAGACCC	65°C
<i>PTPN11</i> -ex5	CCACTGCACCCAGCCTATTA	TGGGTACATGGAGGCTGATG	60°C
<i>PTPN11</i> -ex6	CCCTCTGTCCGTGCCTTTAT	GCCACCAGTCCAAACCAAAA	60°C
<i>PTPN11</i> -ex7	TTTCGAACTCCTGCCCTGAA	GCTAACAAGAGCACACGACC	60°C
<i>PTPN11</i> -ex8	GACATCAGGCAGTGTTCACG	AACACCATCCGCCAAAAGTC	60°C
<i>PTPN11</i> -ex9	TCCTTCCTCATGTCCTGAAAGT	TGGAGCCAAGAAGCTCAACA	60°C
<i>PTPN11</i> -ex10	CAGATGCGAAACAGGCCATT	CGATGAGGGCAGGAACACTA	60°C
<i>PTPN11</i> -ex11	CTTTCAGTGGAACCTGGGGA	GTCCCTCAATGCAGTTGCTC	60°C
<i>PTPN11</i> -ex12	ACTTACCTCAGGCACGTGT	TCGTGAGCACTTTCCTTCCA	60°C
<i>PTPN11</i> -ex13	AGGGAATCCTGACTTCTGCC	CGTATCCAAGAGGCCTAGCA	60°C
<i>PTPN11</i> -ex14	GCGTGACTCTGTGCTTTCAA	AGTAGGGCAACAGGAACGTG	60°C
<i>PTPN11</i> -ex15	CTCCCTGGGAATGTCAGGTC	AGGGAGAGGAAAAAGGAGCC	50°C

Tabla 3.7. Secuencias de las oligos de la región codificante del gen *PTPN11* y sus temperaturas de hibridación (Td y Th).

Las condiciones de amplificación fueron iguales para todos los fragmentos (*tabla 3.8*):

Condiciones de amplificación del gen <i>PTPN11</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.8. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *PTPN11*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.3 Gen *FBN1* (asociado al síndrome de Marfan)

Los cebadores y las condiciones de amplificación (*tablas 3.9 y 3.10*) para este gen, fueron publicados con anterioridad (Nijbroek *et al.*, 1995). Sin embargo, para los exones 54, 56, 57 se rediseñaron mediante UCSC-InSilico PCR.

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>FBN1</i> -ex4	AACTCCTGTGAGCTGTTGC	GCTGTGTCCCAGGTAATCG	58°C
<i>FBN1</i> -ex37	GTAGAAAGATTCTGCCTGATG	GAAGTGGCTGGAGTTGAAAT	58°C
<i>FBN1</i> -ex50	ACGGACTCAGTAGGAAAGC	CAGTCTGCACCCTGCATG	60°C
<i>FBN1</i> -ex54	GGTTCCTTTTGTGCTGTC	TCACCTTGCACACTCTACG	60°C
<i>FBN1</i> -ex56	TTTGGTCCTTCAATAAAATCA	TGTGGAGGCTGAGGTTAG	52°C
<i>FBN1</i> -ex57	ATTCCTGACATCCCCTTG	CAAATAAATAGATTCCCTGCAAG	55°C
<i>FBN1</i> -ex64	CCTACCTTGCTTCCCATTC	AGTTTCTCCCTGGGGAGC	60°C

Tabla 3.9. Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 4, 37, 50, 54, 56, 57 y 64 del gen *FBN1* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del gen <i>FBN1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.10. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *FBN1*. Th: Temperatura de hibridación. Td: Touch Down Degree.

3.2.3.2.4 Genes *EVC1* y *EVC2* (asociados a Ellis Van Creveld)

Se realizó la amplificación de todos los exones de los genes *EVC* y *EVC2*, con las condiciones previamente publicadas (Tompson, *et al.*, 2007). A continuación, se muestran las tablas correspondientes a las condiciones de amplificación de ambos exones (*tablas 3.11- 3.14*).

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>EVC</i> -ex1	ACTGCACAGGCCAGAAAGTC	CCAACCAGGCTCAAGGAGT	Th ₁ 62°C/ Th ₂ 60°C
<i>EVC</i> -ex2	CCAAGCTTGAGAAGCACAGA	CTCAGAAAAGCAGCCCATTG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex3	TGCCTATCATGGTCCCTTTC	AACCCTCAAACAGGACCAAA	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex4	GGACGGAAACTCTGTGGTGT	CCTGGCAGAGTCACTGAACC	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex5	ACCTGGAGTGAGCGTAAGGA	TGTCTGCCCTCTCAAGGGTCT	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex6	ATGGGCCATTGTCATGATTT	TCCCAAATGTGTGCAGAAAA	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex7	AACAACCCCCAGAGCATTTA	CTAGGGCAGAATGCGATAGG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex8	CACTGGAACCAGACAATGGA	AAGGATGTCAAGCCTCAGGA	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex9	CATGAAGGAGAGGGGGAGTT	AGAAGGCCAGTGTGTGGAC	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex10	CTCAAGACGTGGAGGCATCT	TGTAGGGGCTAAGGGACTGA	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex11	CAGGTGCCAACATCCTTCTT	GTGCCCTCAGAGAGGACCAAG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex12	GCATGTGGGGGAGTTACTTG	GAGGGAGATAAGGGCTCTGC	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex13	GTAAATGAAATCGGGGCAGA	GGAAATCGAGGCTAAGAAACG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex14	TAAGAGGATGGCAGCAGAGG	TGATAGGATTCGGGTCTGG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex15	CCTTTCTCCATCCCTTTTCC	GAGGGAGAAGATCCACCTT	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex16	AAACCAGCCATGCACTCTCT	TGAGACAAAGCACGGGATAA	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex17	TGTGCTGGTGGGAAGGATACA	TCACTCATTTGTGCCAGGTG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex18	TCCGAAGATCACATGCAAAG	CAGGCTGGCTTCAGCTATTT	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex19	AGATGCCAGTGTGTCCTCCT	ACACCAGACCCAAGAACTGG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex20	AAAAATGTCAGGCTGGGTTG	TAATGCCTCTGAGGGGACTG	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C
<i>EVC</i> -ex21	AGGGAAACGGGTTTTATTGG	CTAGAGATGCCGCTGTCCTC	Th ₁ 63,5°C/ Th ₂ 57,8°C

Tabla 3.11. Secuencias de las oligos para la amplificación del gen *EVC* y las temperaturas de hibridación (Th₁: Temperatura de hibridación primera. Th₂: Temperatura de hibridación segunda) de los mismos.

Condiciones de amplificación del exón 1 del gen <i>EVC</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	5 µl	94°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	94°C	1 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th ₁ °C	1 min
			72°C	1 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	94°C	5 min
Betaína (Sigma)	5 M	20 µl	94°C	1 min
			Th ₂ °C	1 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	1 min
			72°C	5 min
Agua estéril (Braun)		10.5 µl	4°C	∞

Condiciones de amplificación de los exones 2 al 21 del gen <i>EVC</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	5 µl	94°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	94°C	1 min
			Th ₁ °C	1 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl	72°C	1 min
			94°C	5 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	94°C	1 min
			Th ₂ °C	1 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	1 min
			72°C	5 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.12. Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón 2 al 21 del gen *EVC*. Th₁: Temperatura de hibridación primera. Th₂: Temperatura de hibridación segunda.

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>EVC2</i> -ex1	CTTGGGGTCCTGGTAACCTC	CCCTCCCTTCCTCATTCTTT	Th ₁ 62°C/ Th ₂ 60°C
<i>EVC2</i> -ex2	AAGTGCAATGCTCTCCATGT	CCAGCTTTGAGGTGGAGGTA	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex3	CTGTAGCATCCCAGTGAGCA	AGGCAGCCTAATGCTGAGTC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex4	GTGACAACAGGTGTCCACA	CCTTGCTATTTGTTTCATTGCTC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex5	ACCGTGCTACCCTCCTTCTT	GAACATGCCTGACCCAGAAC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex6	TGCAATACAAAGGGCTTCCT	TCTGCTAGGTGGCATCACTG	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex7	TTCTCTCTGATGGTGAGACC	TCCAGGGAAACCAGTCAGAT	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex8	TGCTTGGTCTGCTCTGACAC	CACAGAACTGGGGGATGAAC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex9	AAAACAGAGGCTCAGGGACA	CAGCATTGGCCTTATGTCA	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex10	AGAAAGCCCTTGCTTACACA	AGGAGGCAATGGACAGATG	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex11	TGTGCATGCATCTGTGTGTT	CCTGTACTCCAAGCCACCAT	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex12	CCGTAGGGCAGTGAAGTTGT	GCCCTCACTCGATCTTGAAC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex13	GCCAACTTCCACCCTAATGA	TCCTGCTGAACACAGCATTC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex14	GGCAACAGAGCAAGATTCAA	CGGGGCGTTGAGTTTATATG	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex15	CACGACATGCATTAGGTGCT	GATAGGGGAGCATGAGGTGA	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex16	TGGCCTAAGGCAGAGTTTGT	GAAGTGAGGGGAGAGGGTTC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex17	CCAGTGCGTCTCCATTGTAA	CCAAAAGGGTTGCTTCTCAG	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex18	AGGTGACACAGGGGTGAGAG	GAGCAATGGGATGACACCTT	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex19	GCAGTCTTTCTGGCCATCTC	GTTGCTGCCATTAGCACTGA	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex20	CGGGAACATGTTTCCAGAC	CTCCCATGACCTTGAGGACT	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex21	CCACTACCACGCCCTGCT	TGTCTGTTGCAGCAACCTC	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C
<i>EVC2</i> -ex22	AATGGTCATGAGCCAGGAAG	TAAACCGAGTCCCTGCAAGT	Th ₁ 62,5°C/ Th ₂ 57,5°C

Tabla 3.13. Secuencias de las oligos para la amplificación del gen *EVC2* y las temperaturas de hibridación (Th₁: Temperatura de hibridación primera. Th₂: Temperatura de hibridación segunda) de los mismos.

Condiciones de amplificación del exón 1 del gen <i>EVC2</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	5 µl	94°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	94°C	1 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th ₁ °C	1 min
			72°C	1 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	94°C	5 min
Betaína (Sigma)	5 M	20 µl	94°C	1 min
			Th ₂ °C	1 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	1 min
			72°C	5 min
Agua estéril (Braun)		10.5 µl	4°C	∞

Condiciones de amplificación de los exones 2 al 22 del gen <i>EVC2</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	5 µl	94°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	94°C	1 min
			Th ₁ °C	1 min
Cebadores F/R	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	72°C	1 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	94°C	5 min
			94°C	1 min
			Th ₂ °C	1 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	1 min
			72°C	5 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.14. Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón1 (imagen superior) y del resto de los exones codificantes (imagen inferior) del gen *EVC2*. Th₁: Temperatura de hibridación primera. Th₂: Temperatura de hibridación segunda.

3.2.3.2.5 Gen *CDMP1* (asociado al síndrome de Grebe)

La amplificación del gen *CDMP1* se llevó a cabo mediante el empleo de cebadores previamente descritos en 2008 (Basit *et al.*, 2008). A continuación, se muestran los oligos y las condiciones para la amplificación del exón 2 del gen *CDMP1* (tablas 3.15 y 3.16).

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>CDMP1</i> -ex2	GCTGGGAGGTGTTTCGACATCT	GCACTCCTGGAATCACAGAGG	60°C

Tabla 3.15. Secuencias de las oligos para la amplificación del gen *CDMP1* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del gen <i>CDMP1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.16. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *CDMP1*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.6 Gen *GJA1* (asociado a la Displasia Oculodentodigital)

Las secuencias de los cebadores que se emplearon para la amplificación del exón 2 del gen *GJA1* (tabla 3.17), fueron publicadas en 2004 (Richardson, *et al.*, 2004). Las condiciones de amplificado mediante PCR se modificaron del artículo previamente citado (tabla 3.18). El volumen final se estableció en 50 µl.

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>GJA1</i> -ex2	GCTGGGAGGTGTTTCGACATCT	GCACTCCTGGAATCACAGAGG	59°C

Tabla 3.17. Secuencias de las oligos para la amplificación del exón2 del gen *GJA1* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del gen <i>GJA1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.18. Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón 2 del gen *GJA1*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.7 Gen *COL1A1* (asociado a la Osteogénesis Imperfecta)

Los cebadores empleados para la amplificación del exones 12 y 38 del gen *COL1A1* fueron diseñados mediante UCSC-InSilico PCR (*tabla 3.19*) y las condiciones de amplificación fueron ajustadas según los requerimientos del laboratorio (*tabla 3.20*).

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>COL1A1</i> -ex12	AAGGGATGGCGGTGATGA	TCCATTTTCACCAGGGCTG	60°C
<i>COL1A1</i> -ex38	TGAATGGCTTGGCCCTCTGTG	AGAGGGAGAACAGCCAACATCCG	60°C

Tabla 3.19. Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 12 y 38 del gen *COL1A1* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del exón 12 y 38 del gen <i>COL1A1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.20. Condiciones de amplificación de los fragmentos del exones 12 y 38 del gen *COL1A1*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.8 Gen *TBX5* (asociado al síndrome de Holt-Oram)

En aquellos individuos con sospecha clínica inicial de síndrome de Holt-Oram se realizó el análisis molecular de la región codificante del gen *TBX5*, para lo cual, se emplearon los cebadores y descritos en 2003 (Brassington, *et al.*, 2003) (*tabla 3.21*). Asimismo, en restos abortivos que manifestaban malformación de miembros con o sin alteración cardíaca.

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>TBX5</i> -ex2	GCTTCTTGTCCTCAGAGCAGAACCT	CAAGAGAAGCCGAGCAGGAAAGCCA	60°C
<i>TBX5</i> -ex3	AGTTTGGGGAAGGAATGCCCACTAC	TTCTCCTCGTCCCTCTCTCTACACA	60°C
<i>TBX5</i> -ex4	AACGGGGCTAGTTTCCGCTTCCACG	CTTTTGGGAGAAGGTTCACATTTT	60°C
<i>TBX5</i> -ex5	CCTGGTGCGTGAAGTGAAGCACGC	GAGGGAGACAAGGCGGGGAATCCAG	60°C
<i>TBX5</i> -ex6	CAGGGTTTTATCTGGAGACAAAGGG	ACGGCCCCAGGCACTGGTTCCTGGG	60°C
<i>TBX5</i> -ex7	ATTAGCTCATGTCCTGAGGTGGTCT	GTGGGGAGGAGAAAGTTGAGGAATC	60°C
<i>TBX5</i> -ex8	CTTTTCTGGTGGATTCTCTCACACC	GGGTAGGAACATGTCAAGGGAAC	60°C
<i>TBX5</i> -ex9a	ACTGCTGTCTCTCCTGTCTTCAC	GGAGAAGTGCTGGTAGGGTAGC	60°C
<i>TBX5</i> -ex9b	CTAGAGGACATCAGCTGCAACAC	ACTTAGCTATTGTCGCTCCACTC	60°C
<i>TBX5</i> -ex9c	CCTGAGTTCCTCTACTCTCATGG	GGACAGACTCCAACCTACGCACTA	60°C

Tabla 3.21. Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones codificantes del gen *TBX5* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Las condiciones de amplificación fueron ajustadas a los requerimientos del laboratorio (*tabla 3.22*):

Condiciones de amplificación del gen <i>TBX5</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.22. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *TBX5*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.9 GEN *TYR* (asociado al Albinismo Oculocutáneo tipo 1)

Los cebadores empleados para la amplificación del gen *TYR* (tabla 3.23), fueron publicados previamente (Lin, *et al.*, 2006) exceptuando el exón 4R que se emplearon los del artículo publicado en el año 2005 (Chaki, *et al.*, 2005).

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>TYR</i> -ex1a	TGTGCTTTTCAGAGGATGAA	CAAACCTGCAGTTCCACAG	58°C
<i>TYR</i> -ex1b	TCTGTCCAATGCACCACTT	GCTTCTGGATTCTTGTTC	58°C
<i>TYR</i> -ex1c	CCCATGTTTAACGACATCAA	TTATACCCTGCCTGAAGAAG	58°C
<i>TYR</i> -ex2	AGGAGTTCCAACATTTCTGC	CCTCCTAGGACTTTGGATAAG	58°C
<i>TYR</i> -ex3F	GCCATTTAATTCCACAAAT	GGTGACAACCTGATCACAGA	56°C
<i>TYR</i> -ex4*	AACATCTTCCATGTCTCCAG	TACAAAATGGCCTATGTAAAGC	54°C
<i>TYR</i> -ex5*	CTCCAAAGGACTGTGAAAGG	GGAGTCAGTTAATGTAGATT	58°C

Tabla 3.23. Secuencias de las oligos para la amplificación del gen *TYR* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. El asterisco indica que en esos exones existe homología con el pseudogen *TYRL*.

Las condiciones de amplificación fueron ajustadas a los requerimientos del laboratorio (tabla 3.24):

Condiciones de amplificación del exón 1, 2,3 y 5 del gen <i>TYR</i>				
Reactivos		CICLOS (n=35)		
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞
Condiciones de amplificación del exón 4 del gen <i>TYR</i>				
Reactivos		CICLOS (n=35)		
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	94°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	94°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	1 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.24. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *TYR*. Th: Temperatura de hibridación. y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

3.2.3.2.10 GEN *OCA2* (asociado al Albinismo Oculocutáneo tipo 2)

Se amplificaron los fragmentos del gen *OCA2* previamente publicados en el año 1995 (*tabla 3.25*) y se ajustaron las condiciones de amplificación a las condiciones del laboratorio (Lee, *et al.*, 1995) (*tabla 3.26*).

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>OCA2</i> -ex6	ATTATACCTTACTGCTCTC	TTTCAGATCTCAGCCAGGCG	58°C
<i>OCA2</i> -ex7	GGACATGGGGTTTCTCCTGT	TGAGATGAAATGAGATTTCAC	59°C
<i>OCA2</i> -ex13	GCCTCTGTTCTACGAGCCTG	TGCCAGAACCTGGCCGCAA	63°C

Tabla 3.25. Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 6, 7 y 13 del gen *OCA2* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del gen <i>OCA2</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.26. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *OCA2*. Th: Temperatura de hibridación.

Para la detección de la delección del exón 7 del gen *OCA2*, empleando la estrategia publicada en 1994 (Durham-Pierre *et al.*, 1994) (*tabla 3.27-3.28*).

Fragmento	Nombre de Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>MHB</i>	<i>MHB51-F</i>	TTTGCTCTAGGTTTCAGGCGAG	58°C
	<i>MHB72-F</i>	GCGGTGGCTGTCATGGC	
	<i>MHB71-R</i>	GGAGGGTGCATTTCATTCTCAG	

Tabla 3.27. Secuencias de las oligos para la amplificación de la región de 2,7 kb del exón 7 del gen *OCA2* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del fragmento 2,7kb del gen <i>OCA2</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl		
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	5 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	95°C	1min
ADN	50 ng/µl	1 µl	Th°C	1 min
Perfect Match (Sigma)	1U/µl	0,2 µl	72°C	1 min
AmpliTaQ Polimerasa (Perkin Elmer Cetus)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		10.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.28. Condiciones de amplificación del fragmentos de 2,7 kb del exón 7 del gen *OCA2*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.11 Gen *GPR143* (asociado al Albinismo Ocular ligado al X)

La amplificación de los fragmentos codificantes del gen *GPR143* se emplearon los cebadores descritos en 2008 (tabla 3.29). Las condiciones de amplificación de dichos fragmentos se pusieron a punto según los requerimientos del laboratorio (Fang *et al.*, 2008) (tabla 3.30).

Fragmento	Secuencia Forward (5' - 3')	Secuencia Reverse (5' - 3')	Touch Down Degree (Td)	Temperatura de hibridación (Th)
<i>GPR143</i> -ex1a	GCGTTAGCCCAGTGCTCTC	GCGCTGATCAGATTCCAAC	60°C(-1°C/ ciclo)	52°C
<i>GPR143</i> -ex1b	CCGCGCCTAGGGACCTTCTGCT	AACCCGCGGGCCTCTCGTCCTCAC	-	70°C
<i>GPR143</i> -ex2	TGATTAGGATCAGATACAAAG	GATTTGAGGAGCATAAGTAGG	-	56°C
<i>GPR143</i> -ex3	TTCTTGACCTGTTTCCAGAC	TCAGTGCCATCTCTTATCTTC	-	60°C
<i>GPR143</i> -ex4	TGAGCTGTGGCTGCTGTTGT	GCTCATGTATTCCCTGCAAGA	-	60°C
<i>GPR143</i> -ex5	GCATTTCCCTTTTGTCTCATCC	AGGCCTGCACATTTTCATTATTG	-	64°C
<i>GPR143</i> -ex6	CTGTCACTCCGTAAACATGAA	TTCCATAGCCCTTCCCACTGG	-	56°C
<i>GPR143</i> -ex7	TGCACCTGGCCCTCTAGTTTC	TTGAGCCCAGGAGTTTAAGGCT	-	64°C
<i>GPR143</i> -ex8	TCTGTGACAGCCCAGGGCT	CGGGACAAAGAATCCTCTAAGGC	-	64°C
<i>GPR143</i> -ex9	AGCTGATGACAAACCTGCTAG	CCTTTCTCCTATCCTAAAGGC	-	57°C

Tabla 3.29. Secuencias de las oligos para la amplificación de la región codificante del gen *GPR143* y las temperaturas de hibridación (Td y Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del exón 1 del gen <i>GPR143</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Td°C	20 s
GCRich (Roche)	5X	10 µl	72°C	40 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	95°C	20 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	Th°C	20 s
			72°C	40 s
			72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		23.5 µl	4°C	∞

Condiciones de amplificación del exón 1b del gen <i>GPR143</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
GCRich (Roche)	5X	5 µl	72°C	40 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	7 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Condiciones de amplificación del exón 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen <i>GPR143</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.30. Condiciones de amplificación de los fragmentos del exón 1a (imagen superior), exón 1b (imagen central) y de los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (imagen inferior) del gen *GPR143*. Th: Temperatura de hibridación. Td: Touch Down Degree.

3.2.3.2.12 Gen *PITX2* (asociado al síndrome de Axenfeld-Rieger)

Se pusieron a punto los exones 5 y 6 del gen *PITX2* para el cribado de mutaciones en pacientes con sospecha clínica del síndrome Axenfeld-Rieger. En las siguientes tablas (*tabla 3.31-3.32*) se detallan tanto la secuencia de los cebadores utilizados para este estudio como las condiciones de amplificación de dichas regiones.

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>PITX2</i> -ex5	CAGCTCTTCCACGGCTTCT	TTCTCTCCTGGTCTACTTGG	60°C
<i>PITX2</i> -ex6	GTAATCTGCACTGTGGCATC	AGTCTTTCAAGGGCGGAGTT	54°C

Tabla 3.31. Secuencias de las oligos para la amplificación de los exones 5 y 6 del gen *PITX2* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos.

Condiciones de amplificación del exón 5 y 6 del gen <i>PITX2</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	20 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.32. Condiciones de amplificación de los exones 5 y 6 del gen *PITX2*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.13 Gen *FOXC1* (asociado al síndrome de Axenfeld-Rieger)

Se realizó la amplificación del gen *FOXC1* con los cebadores diseñados mediante UCSC-In silico PCR (*tabla 3.33*) para el cribado de mutaciones en pacientes con sospecha clínica del síndrome Axenfeld-Rieger que solo tienen manifestaciones oculares, o en aquellos pacientes con alteraciones sistémicas que no han presentado mutaciones en el gen *PITX2*.

Las condiciones de amplificación del gen *FOXC1*, se adecuaron a los requerimientos del laboratorio (*tabla 3.34*).

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>FOXC1</i> -ex1a	CCCGGACTCGGACTCGGC	AAGCGGTCCATGATGAAGTGG	60°C
<i>FOXC1</i> -ex1b	CCCAAGGACATGGTGAAGC	CTGAAGCCCTGGCTATGGT	60°C
<i>FOXC1</i> -ex1c	ATCAAGACCGAGAACGGTACG	GTGACCGGAGGCAGAGAGTA	60°C
<i>FOXC1</i> -ex1d	TACCACTGCAACCTGCAAGC	GGGTTCGATTAGTTCGGCT	60°C
<i>FOXC1</i> -ex1d-6FAM*	TACCACTGCAACCTGCAAGC		

Tabla 3.33. Secuencias de las oligos para la amplificación del gen *FOXC1* y las temperaturas de hibridación (Th) de los mismos. * Este cebador marcado con fluorocromo se resolvió mediante análisis de fragmentos con el programa Gene Mapper V.4.0.

Condiciones de amplificación del fragmento 1a del gen <i>FOXC1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón sin MgCl ²	10X	2,5 µl	95°C	5 min
MgCl ²	2 mM	1 µl	95°C	20 s
dNTPs	1,25 mM	4 µl	Th°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1,25 µl / 1,25 µl	72°C	40 s
GCRich (Roche)	5X	5 µl	72°C	7 min
ADN	50 ng/µl	2 µl	4°C	∞
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'2 µl		
Agua estéril (Braun)		7,8 µl		
Condiciones de amplificación del fragmento 1b y 1c del gen <i>FOXC1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón sin MgCl ²	10X	2,5 µl	95°C	5 min
MgCl ²	2 mM	1 µl	95°C	20 s
dNTPs	1,25 mM	4 µl	Th°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1,25 µl / 1,25 µl	72°C	40 s
DMSO (Merck)	10X	2,5 µl	72°C	7 min
ADN	50 ng/µl	2 µl	4°C	∞
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'2 µl		
Agua estéril (Braun)		10,3 µl		
Condiciones de amplificación del fragmento 1d del gen <i>FOXC1</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón sin MgCl ²	10X	2,5 µl	95°C	5 min
MgCl ²	2 mM	1,25 µl	95°C	20 s
dNTPs	1,25 mM	4 µl	Th°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1,25 µl / 1,25 µl	72°C	40 s
DMSO (Merck)	10X	2,5 µl	72°C	7 min
ADN	50 ng/µl	2 µl	4°C	∞
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'2 µl		
Agua estéril (Braun)		10,05 µl		

Tabla 3.34. Condiciones de amplificación de los fragmentos 1a (imagen superior), de los fragmentos 1b y 1c (imagen central) y del fragmento 1d (imagen inferior) del gen *FOXC1*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.2.14 GEN *SHH* (asociado a Holoprosencefalia)

La secuencia de los cebadores empleados para la amplificación del gen *SHH* fueron publicados en 1997 (Roessler *et al.*, 1997) (tabla 3.35) y las condiciones de amplificación se pusieron a punto en función de los requerimientos del laboratorio (tabla 3.36).

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>SHH</i> -ex1	CAGCCAGCGAGGGAGAGAGCGAGCGGGCGA	TAAGTCTGGAAGTGTTCGGCTTCTC	60°C
<i>SHH</i> -ex2a	GGCAGGCTGATGGAGGGGCCGGA	GACGTGGTGTGTCCACTGCGCGGC	60°C
<i>SHH</i> -ex2b	CCACTCAGAGGAGTCTCTGCACTA	AAAGCAGTCATGCCCAGCGACCTGC	60°C
<i>SHH</i> -ex3a	CCTCCCTCTCGGAATCAATGCCCTGTC	TGCGCGGCGGTGAGCAGCAGGCGCTCGCGC	60°C
<i>SHH</i> -ex3b	CCAAGAAGGTCTTCTACGTGATCG	AGCCGGCGGTCCCGTCACGCTCG	65°C
<i>SHH</i> -ex3c	GCCCGGGCCAGCGCGTGTACGTGG	CCAGTGCAGCCAGGAGCGCGTGCG	70°C

Tabla 3.35. Secuencias y las temperaturas de hibridación (Th) de los oligos para la amplificación del gen *SHH*.

Condiciones de amplificación del exón 1,2a, 2b y 3a del gen <i>SHH</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	30 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	30 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	50 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞
Condiciones de amplificación del fragmento 3b del gen <i>SHH</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	10 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	30 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	1,30 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	20 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞
Condiciones de amplificación del fragmento 3c del gen <i>SHH</i>				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ²	10X + 2mM	5 µl	95°C	5 min
dNTPs	1,25 mM	8 µl	95°C	1 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	Th°C	45 s
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	1,30 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0.5 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		30.5 µl	4°C	∞

Tabla 3.36. Condiciones de amplificación de los exón 1, 2 y el fragmento 3a (imagen superior), del fragmento 3b (imagen central) y del fragmento 3c (imagen inferior) del gen *SHH*. Th: Temperatura de hibridación.

3.2.3.3 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

Tras la PCR, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%, se testaron 5 µl del producto amplificado por PCR a partir de ADN de los pacientes, observando producto en todas las muestras. Se diseñaron las condiciones para evitar las bandas inespecíficas y así poder purificar las muestras por métodos que parten del producto de PCR.

La mayoría de los exones se purificaron mediante el kit E.Z.N.A® Cycle-Pure (Omega-Biotech), siguiendo las recomendaciones del fabricante y los exones que se amplificaron en placas de 96 pocillos Micro Amp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mediante ExoSAP-IT® (Affymetrix), se purificaron 2.5 µl de producto de PCR para lo cual se incubó 37° C durante 15 minutos con 1 µl de ExoSAP-IT para degradar los cebadores y dNTPs remanentes y después, se inactivó el ExoSAP-IT incubando 80°C otros 15 minutos.

En cambio el exón 3c del gen *SHH* y el exón 4 del gen *TBX1*, se cortaron la banda correspondiente a su respectivo tamaño del producto de PCR en el gel de agarosa y se purificaron empleando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

3.2.3.4 SECUENCIACIÓN SANGER

Tras la purificación de cada producto de PCR ya fuera en tubos o en placa se realizó la reacción de secuenciación de la siguiente forma: en la reacción de secuenciación se empleó un premix (ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystem) que incorpora como reactivos: dNTPs (90%), ddNTPs (10%), tampón de la Taq polimerasa a 1X con 15mM de MgCl₂ y 1U de AmpliTaq Gold polimerasa, a un volumen final de 20 µl .

Los ciclos de secuenciación se programaron en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA) (*tabla 3.37*). En el caso del exón 3 reverse del gen *TBX1* y el exón 6 reverse del gen *TBX5* se modificó la temperatura de hibridación de secuenciación a 58°C y a 55°C, respectivamente.

Condiciones de secuenciación automática				
Reactivos			CICLOS (n=25)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón BigDye	5X	2,4 µl	95°C	5 min
BigDye v1.1	2,5 X	0,5 µl	95°C	5 s
Cebadores Fo R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl	50°C	10 s
ADN purificado		3,5 µl	72°C	4 min
Agua estéril (Braun)		6,35 µl	72°C	20 min
			4°C	∞

Tabla 3.37. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos de la reacción de secuenciación.

La purificación de la reacción de secuenciación, a partir de tubos de 0,2 ml, se llevó a cabo mediante el empleo de las columnas de SEPHADEX (Centri-Sep spin columns fabricado por Princeton Separation, NJ, USA), añadiendo 10 µl de formamida ultra pura, a 10 µl del producto final de secuenciación. Esta mezcla se resolvió mediante electroforesis capilar 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y se analizaron posteriormente, con el programa informático Sequencing Analysis v.5.2. En cambio, la reacción de secuenciación de la placa de 96 pocillos Micro AmpTM Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) se purificó al vacío, mediante el kit de Montage SEQ96 sequencing Reactor Cleanup (Millipore).

3.2.3.5 SECUENCIACIÓN MASIVA

Dos de las familias de Marfan (Marfan 4 y Marfan 8), en las que no se pudo externalizar el estudio del gen *FBNI*, fueron seleccionadas posteriormente como candidatas para ser analizadas mediante la técnica de secuenciación masiva que se puso a punto en Marzo de 2013 y que se encuentra actualmente en proceso de validación. Se empleó para este análisis el kit de Marfan MASTR Assay de Multiplicom (www.multiplicom.com), que incluye reacciones para los 66 exones del gen *FBNI*. La amplificación clonal mediante PCR en emulsión y pirosecuenciación se realizó siguiendo el protocolo standard de 454 GS Junior (454 Life Sciences, Branford, CT, USA). El posterior análisis bioinformático se realizó mediante el programa GS Amplicon Variant Analyzer (A.V.A), usando el script de Marfan proporcionado por Multiplicom. Las variantes consideradas de interés fueron confirmadas mediante secuenciación Sanger.

3.2.3.6 MINISECUENCIACIÓN .

La técnica de minisecuenciación se realizó para la detección de mutaciones previamente identificadas, en muestras de ADN fetal disponible en el plasma materno. Dado que el ADN fetal está muy fragmentado, se emplearon cebadores con el fin de obtener un amplicón de un tamaño relativamente pequeño, de aproximadamente 187 pb. El diseño de dichos cebadores del gen *GJA1* (tabla 3.38) se realizó mediante el software In silico PCR.

Fragmento	Secuencia <i>Forward</i> (5' - 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' - 3')	Temperatura de hibridación (Th)
<i>GJA1</i> -2 (fetal)	TCAGGTTGCCCAAAGTGAT	CTCTTTCCCTTAACCCGATC	62°

Tabla 3.38. Secuencias de los oligos del fragmento de 187 pb del exón 2 gen *GJA1* para la amplificación de dicho fragmento a partir de ADN fetal procedente de plasma materno previa a la minisecuenciación y la temperatura de hibridación de los cebadores (Th).

En primer lugar, se realizó la amplificación del exón 2 del gen *GJA1* con las condiciones de PCR especificadas a continuación (tabla 3.39).

Condiciones de amplificación de fragmento <i>GJA1</i> -2 (fetal)				
a partir de ADN fetal a partir de plasma materno				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
MasterMix (QIAGEN)	2X	12,5 µl	95°C	15 min
			96°C	15 s
Buffer Q (QIAGEN)	8X	2 µl	Th°C	10x 1,30 min
			72°C	1 min
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10 pmol/µl	1 µl / 1 µl	95°C	15 s
			Th°C	30x 1,30 min
ADN	50 ng/µl	2 µl	72°C	1 min
			72°C	15 min
Agua estéril (Braun)		6,5 µl	4°C	∞

Tabla 3.39. Condiciones para la amplificación del fragmento de 187 pb del exón 2 gen *GJA1* previa a la minisecuenciación. Th: Temperatura de hibridación.

Tras comprobar la presencia del amplicón en un gel de agarosa al 3%, se realizó la purificación de 5 µl de PCR, mediante la adicción de 2 µl de ExoSAP-IT® (Affymetrix) incubando 15 min a 37°C y otros 15 min a 80°C. Posteriormente, en frío (4°C), se añadió 3 µl de coctel de SNaShot®, 1 µl de sonda, que hibrida adyacente a la mutación previamente identificada (*tabla 3.40*) y 3 µl de agua, al volumen previamente purificado. A continuación se realizó la reacción mediante las condiciones que especificadas en la *tabla 3.41*.

Sonda	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Concentración
CONN43-Sonda	AGCATGGTAAGGTGAAAATGC	0,4 µM

Tabla 3.40. Secuencias y concentración de la sonda CONN43 empleada en la minisecuencia.

Condiciones de minisecuencia	
CICLOS (n=25)	
Temperatura	Tiempo
95°C	5 min
95°C	5 s
50°C	10 s
72°C	4 min
72°C	20 min
4°C	∞

Tabla 3.41. Condiciones para la reacción de minisecuencia.

Posteriormente, se eliminaron los ddNTPS no incorporados añadiendo 1 µl del reactivo SAP y 1,2 µl de tampón específico para la enzima SAP (10X) al volumen anterior, e incubando a 37°C durante 1h y a 75°C durante 15 min. Finalmente, se resolvió mediante electroforesis capilar 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a partir de 1 µl de producto de minisecuencia purificado junto con 12 µl de formamida y 0,5 µl de marcador GS500LIZ y se analizaron posteriormente, con el programa informático GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA).

3.2.3.7 ENSAYO MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los ensayos de restricción se utilizó para confirmar la presencia o ausencia de una mutación, en los familiares de un caso índice, donde previamente se le ha identificado un cambio nucleotídico, por secuenciación Sanger del gen asociado a su enfermedad. Se introdujo un fragmento de la secuencia en la que se ubica el cambio nucleotídico identificado en el paciente, en el programa informático NEBcutter V2.0, para la búsqueda de endonucleasas de restricción, que reconozcan dicho cambio ya sea por la generación de una nueva diana de restricción o por la eliminación de una diana ya existente.

La enzima de restricción utilizada fue la enzima *XcmI* (New England BioLabs) (*tabla 3.42*). El fragmento de interés fue previamente amplificado mediante PCR en el paciente y en sus familiares. Posteriormente, se realizó la reacción de digestión del producto amplificando (*tabla 3.43*), se incubó la reacción a 37°C durante 3 horas y se resolvió en un gel de agarosa al 3%.

Enzimas y dianas		Digestión	
Enzima	Diana	Temperatura	Tiempo
Xcm I	5'...CCANNNNN↓NNNTGG...3'	37°C	3 horas

Tabla 3.42. Enzimas de restricción utilizadas, dianas que reconocen y condiciones de la digestión.

Reactivos	
Reactivos	Volúmenes
ADN (producto de PCR)	10 µl
Tampón	2 µl
Enzima de restricción (10 unidades/µl)	3 µl
Agua	csp 20 µl

Tabla 3.43. Reactivos de la digestión. El volumen final de la reacción fueron 20 µl.

3.2.3.8 PCR A TIEMPO REAL (qPCR)

3.2.3.8.1 Cuantificación Absoluta

-A partir de las muestras de ADN extraído de plasma, se realizó la amplificación mediante PCR cuantitativa, empleando cebadores y sondas TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA) para el gen *SRY* para la determinación del sexo fetal en dichas muestras y para el gen *GAPDH* (gliceraldehido fosfato deshidrogenasa) como control interno tanto de la extracción de ADN como de la amplificación de forma independiente (Bustamante-Aragones *et al.*, 2008).

- Cada muestra de ADN se estudió por triplicado para el gen *SRY* y por duplicado para el gen *GAPDH*. Asimismo, se incluyeron 2 controles genómicos masculino y femenino como controles de amplificación del gen *SRY*.

-Para la detección de presencia ausencia del gen *SRY*, se analizaron los datos mediante cuantificación relativa en ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA).

3.2.3.8.2 Cuantificación Relativa (SYBR Green)

-Se empleó la cuantificación relativa mediante PCR cuantitativa para determinar dosis génica a partir de muestras de ADN donde o bien no se han descrito microsatélites internos al locus de interés o la amplificación de los microsatélites ha resultado no informativa en las familias analizadas o bien no había suficientes familiares para la determinación del haplotipo.

-Se alicuotaron todas las muestras a la 50 ng/μl deADN para cada individuo. Cada muestra del paciente y sus familiares (“*Unknown: Uk*”), se analizaron por triplicado, tanto para el gen diana *OCA2* (“*Target: Tar*”) de la patología en estudio, como para el gen *GAPDH*, empleado como gen de referencia (“*Reference: Ref*”). Además, se empleó como calibrador la amplificación de ADN de un control sano (“*Postcalibrator: Posc*”) perteneciente a la población española para ambos genes (*figura 3.3*).

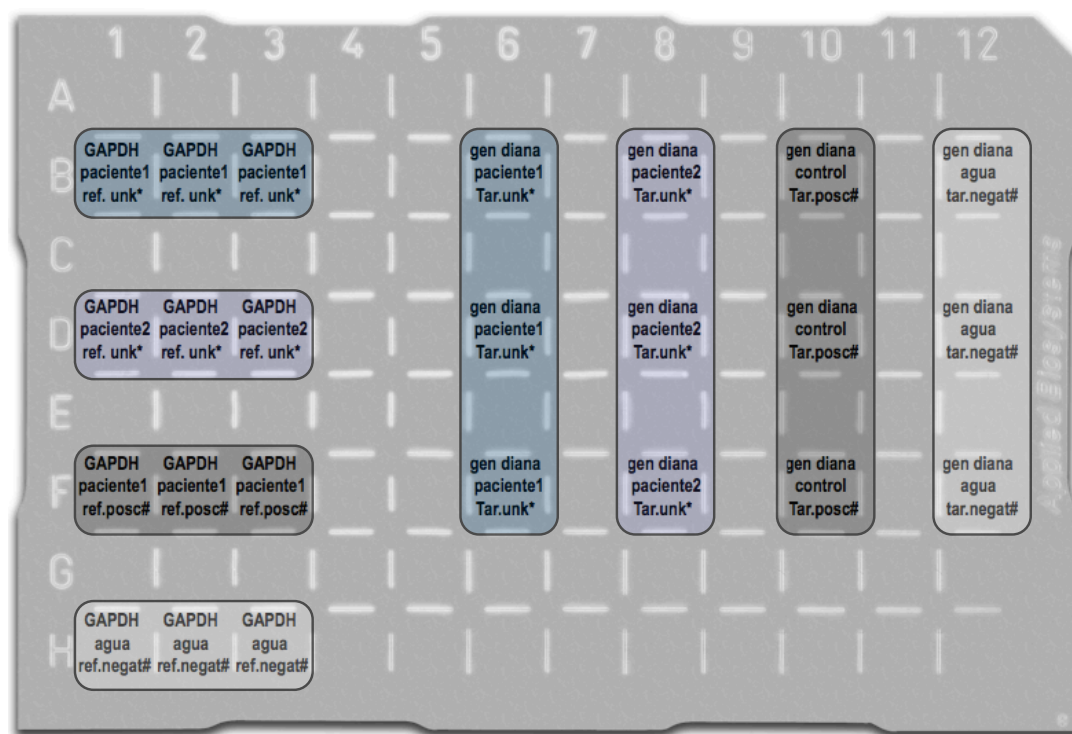


Figura 3.3. Plantilla de PCR empleada para la amplificación de OCA2 y GAPDH en pacientes y controles para la cuantificación relativa de los mismos mediante PCR a tiempo real.

-La reacción de PCR a tiempo real se realizó en el Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) para lo cual, se empleó SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany).

-Los datos se analizaron mediante el método DDCT para el análisis cuantitativo relativo (RQ) a través de la fórmula $RQ=2^{-(DDCt)}$. Los algoritmos matemáticos que se emplean en Roche sustituyen el Ct por Cp, siendo este último el máximo valor de la segunda derivada de la curva de amplificación con el eje de las ordenadas.

3.2.3.9 ARRAYS

3.2.3.9.1 Array de hibridación genómica comparada (aCGH) de 1 Mb

Se empleó el array de 1 Mb sintetizado por VIB-MAF (Leuven, Bélgica). Este array contiene 3,527 clones BAC y PAC , distribuidos a lo largo del genoma.

Se midieron las muestras mediante el espectofotómetro Nano Drop ND-1000 versión 3.1 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) y se hizo una primera dilución de cada muestra por duplicado, de aproximadamente 25ng/μl. Se calculó el volumen de cada muestra necesario para obtener 150ng y se llevó a un volumen de 10.5 μl añadiendo agua destilada y se añadieron 10μl de un cóctel de cebadores aleatorios, distribuidos por todo el genoma, también conocidos como “*Random Primers*”. El protocolo se llevó a cabo mediante los dos siguientes procedimientos detallados a continuación: a) marcaje, b) purificación e hibridación.

a) Marcaje

- Se homogeneizaron las muestras y se centrifugaron en la minifuga 1 minuto.
- Se incubaron 15 minutos las muestras en un baño a 98°C e inmediatamente, se paró la desnaturalización trasladando las muestras al hielo durante 5 minutos, se realizó una centrifugación rápida de 1 minuto y se dejó en hielo.
- Se añadió 2.5 μl de dNTPs y se añadieron 1.5 μl de dCTP-Cy5 en las muestras y dCTP-Cy3 en las referencias. Se homogeneizaron las muestras y se centrifugaron en la minifuga 1 min.
- Se añadió 0.6 μl del fragmento exoklenow, se homogeneizó vigorosamente y se centrifugó durante 1 minuto. Posteriormente, se incubaron a oscuras a 37° C en el baño toda la noche.

b) Purificación e hibridación

- Se centrifugaron en la minifuga y se añadieron 2,5 μl de tampón de parada, 75 μl de pH 8 (10 mM Tris/HCl; 1 mM de EDTA) y 400 μl de Buffer A. Se homogeneizó en un vórtex y se centrifugó en la minifuga.
- Se transfirió a la columna y se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm y se añadieron 600 μl Buffer B, se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm.

Se realizó la medición de la fluorescencia mediante un escáner específico y se exportaron los datos a una hoja de cálculo de Microsoft Excel, mediante la cual, se mostró gráficamente los resultados, según el logaritmo en base dos de las diferencias registradas de fluorescencia de cada clon, ordenados según su posición cromosómica. El valor aquel que supere el umbral de significación de 4 veces la desviación estándar de los puntos será positivo.

3.2.3.9.2 Array de CGH de 400K (qGenomics)

-Se solicitó el estudio mediante hibridación genómica comparada, utilizando el array Agilent 400K (qGenomics) de 3 muestras de ADN de los casos índice de las familias con sospecha clínica de Holt-Oram seleccionadas por presentar alteraciones en el patrón de MLPA de los kits p179 y p180 y de 7 muestras de tejido de abortos, que presentaban malformación de miembros y/o cardiopatía. Los resultados fueron analizados y evaluados teniendo en cuenta la clínica de los pacientes.

3.2.3.10 REACCIÓN SEMICUANTITATIVA FLUORESCENTE EN CADENA DE LA POLIMERASA (QFPCR)

El abordaje de las aneuploidías más frecuentes y compatibles con la vida, se llevó a cabo en todas las muestras de ADN extraídos de los abortos, como complementación a los estudios citogenéticos. Para ello, se estudiaron microsatélites polimórficos del kit ABI PRISM® Linkage Mapping Sets V.2.5 MD10 (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA), en 4 multiplex (PCR A, PCR B, PCR C y PCR D), diferenciadas en los marcadores moleculares empleados (*tabla 3.44*). La PCR A y B, que amplifican microsatélites localizados en los cromosomas 13, 18, 21, X e Y implicados en las anomalías cromosómicas más frecuentes, se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el año 2001 (Adinolfi & Sherlock, 2001). Sin embargo, las PCR C y D amplifican microsatélites localizados en los 15, 22, 16 y X, para la detección de las siguientes aneuploidías más frecuentes (Diego-Alvarez *et al.*, 2005).

MARCADOR	FLUOROCROMO	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	TIPO DE REPETICIÓN	HETEROCIGOSIDAD	SECUENCIA DE CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN
QF-PCR A						
Amelogenina	6-FAM	Xp22.1-Xp22.3/ Yp11.2	-	-	F: 5'- CCTGGGCTCTGTAAAGAATAAGTG-3' R: 5'- ATCAGAGCTTAACTGGGAGCTG-3'	106 pb (Cromosoma X) 112 pb (Cromosoma Y)
D13S631	NED	13q32.2	Tetranucleotídica	0.94	F: 5'- GGCCACAAGAGCAAACTCT-3' R: 5'- TAGCCCTCACCATTGG-3'	195 pb - 215 pb
D18S535	VIC	18q12.3	Tetranucleotídica	0.92	F: 5'- TCAATGTGACAAAAGCCACAC-3' R: 5'- AGACAGAAATAGATGAGAATGCA-3'	130 pb - 154 pb
D21S1414	6-FAM	21q21.1	Tetranucleotídica	0.88	F: 5'- AAATTAGTGTCTGGCACCAGTA-3' R: 5'- CAATTCCCAAGTGAATTCCTTC-3'	344 pb - 364 pb
QF-PCR B						
X22	6-FAM	Xq28/Yqter	Pentanucleotídica	0.87	F: 5'- TAATGAGTGTGGAAGAAA-3' R: 5'- CCCATTGTTGCTACTGAGA-3'	198 pb - 238 pb
XHPRT	6-FAM	Xq26.1	Tetranucleotídica	0.85	F: 5'- ATGCCACAGATAATACATCCCC-3' R: 5'- CTCCTCAGAAATAGTAGATGAGGTAT-3'	280 pb - 296 pb
D13S634	NED	13q14.13	Tetranucleotídica	0.81	F: 5'- TCCAGATAGGCAGATTCAAT-3' R: 5'- CCTTCTCTCCCATTCAT-3'	466 pb - 498 pb
D18S386	VIC	18q22.1-18q22.2	Tetranucleotídica	0.88	F: 5'- TCAGGAGAATCAGTTGGAAC-3' R: 5'- TCCATGAAGTAGTAAGCAG-3'	337 pb - 389 pb
D21S1411	NED	21q22.3	Tetranucleotídica	0.93	F: 5'- ATGATGAATGCATAGATGATG-3' R: 5'- AATGTGTGCTTCCAGGC-3'	269 pb - 321 pb
QF-PCR C						
DXS8076	NED	Xq21.1	Dinucleotídica	0.68	F: 5'- AACTTAGGATACCCCAATTATGTG-3' R: 5'- AGTGCTACTCCACAAACAG-3'	93 pb - 101 pb
D15S1050	PET	15q22.31	Dinucleotídica	0.77	F: 5'- TGGAACATCTGTCAATAGTGG-3' R: 5'- TCCTGTTTATCATCTTCA-3'	285 pb - 297 pb
D16S753	6-FAM	16p11.2	Tetranucleotídica	0.75	F: 5'- CAGGCTGAATGACAGAACAA-3' R: 5'- ATTGAAACAACTCCCTTCA-3'	261 pb - 281 pb
D22S689	VIC	22q12.1	Tetranucleotídica	0.73	F: 5'- TATGTACAGACCTGCAACTTGC-3' R: 5'- CCTGCTGCTATCTATCTG-3'	205 pb - 237 pb
QF-PCR D						
DXS1002	6-FAM	Xq21.2	Dinucleotídica	0.7	F: 5'- CTGCTACCTTTAGTCTCTC-3' R: 5'- TCCATGTTCTGCGAA-3'	266 pb - 274
D15S123	NED	15q21.1	Dinucleotídica	0.73	F: 5'- AGCTGAACCTCAATGGACT-3' R: 5'- TTTCATGCCACCAACAA-3'	188 pb - 206 pb
D16S539	6-FAM	16q24.1	Tetranucleotídica	0.79	F: 5'- GATCCCAAGCTCTCTCTT-3' R: 5'- ACGTTGTGTGTGTCATCTGT-3'	145 pb - 169 pb
D22S280	VIC	22q12.3	Dinucleotídica	0.79	F: 5'- GCTCCAGCTATCAGATG-3' R: 5'- GATTCCAGATCACAAAAGTGGT-3'	216 pb - 228 pb

Tabla 3.44. Marcadores empleados para la técnica QF-PCR

Se añadió 1 µl de ADN, a una concentración de 50 ng/µl, en placa 96 pocillos Micro Amp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, USA) y posteriormente, el robot Biomek NXp (Beckman Coulter, USA) repartió en la placa 24 µl, la mezcla de la PCR A y B y los 14 µl de la PCR C y D que contenían: 1,25 µM de dNTPs (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA), 1U de AmpliTaq Gold polimerasa de enzima, tampón de la Taq polimerasa a 1X con 15mM de MgCl₂, y entre 1,26-37,5 pmol/µl de cebadores de los marcadores especificados anteriormente. Los fragmentos se amplificaron mediante el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA), bajo las condiciones de tiempo y temperatura descritas en la siguiente tabla (*tabla 3.45*).

Condiciones de la QF-PCR A				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂ (Roche)	10X + 2mM	2,5 µl		
dNTPs (Invitrogen)	1,25 mM	4 µl		
Amelogenina F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	0,18 µl / 0,18 µl	95°C	5 min
D13S631 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1,5 µl / 1,5 µl	95°C	1 min
D18S535 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1,5 µl / 1,5 µl	55°C	1 min
D21S1414 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1,5 µl / 1,5 µl	72°C	1,30 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	7 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0,2 µl	4°C	∞
Agua estéril (Braun)		7,94 µl		
Condiciones de la QF-PCR B				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂ (Roche)	10X + 2mM	2,5 µl		
dNTPs (Invitrogen)	1,25 mM	4 µl		
X22 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	0,25 µl / 0,25 µl	95°C	5 min
HPRT F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	0,5 µl / 0,5 µl	95°C	1 min
D13S634 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1,5 µl / 1,5 µl	55°C	1 min
D18S386 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1,5 µl / 1,5 µl	72°C	1,30 min
D21S1411 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1,5 µl / 1,5 µl	72°C	7 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	4°C	∞
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0,2 µl		
Agua estéril (Braun)		8,8 µl		

Tabla

Tabla 3.45. Condiciones de las reacciones QF-PCR A (imagen superior), QF-PCR B y QF-PCR C (imágenes centrales) y QF-PCR D (imagen inferior) (*Continúa*) .

Condiciones de la QF-PCR C				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ² (Roche)	10X + 2mM	1,5 µl		
dNTPs (Invitrogen)	1,25 mM	1,5 µl		
D15S1050 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	95°C	5 min
D16S753 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	95°C	1 min
D22S689 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	55°C	1 min
DXS8076 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	72°C	1,30 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	7 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'2 µl	4°C	∞
Agua estéril (Braun)		2,8 µl		
Condiciones de la QF-PCR D				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ² (Roche)	10X + 2mM	1,5 µl		
dNTPs (Invitrogen)	1,25 mM	1,5 µl		
D15S123 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1,8 µl / 1,8 µl	95°C	5 min
D16S539 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	0,3 µl / 0,3 µl	95°C	1 min
D22S280 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	55°C	1 min
DXS1002 F/R (Applied Biosystems)	10pmol/µl	2 µl / 2 µl	72°C	1,30 min
ADN	50 ng/µl	1 µl	72°C	7 min
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'2 µl	4°C	∞
Agua estéril (Braun)		0,6 µl		

Tabla 3.45 (Continuación). Condiciones de las reacciones QF-PCR A (imagen superior), QF-PCR B y QF-PCR C (imágenes centrales) y QF-PCR D (imagen inferior).

Finalmente, se resolvió mediante electroforesis capilar en el 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA), 1 µl de producto final de la reacción junto con 0,5 µl de marcador de peso molecular (Gene Scan GS500LIZ) y 12 µl de formamida ultra pura. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa informático Gene Mapper v 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA). Además, aquellos casos en los que fue requerido, se realizó esta técnica empleando marcadores específicos de los cromosomas a estudiar.

3.2.4 TÉCNICAS MOLECULARES: ANÁLISIS INDIRECTOS

3.2.4.1 STRs: ANÁLISIS DE FRAGMENTOS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES (STRs: *Short Tandem Repeats*)

Se emplearon los STRs disponibles para todos los cromosomas en los paneles de Linkage Mapping Sets 2.5 (Applied Biosystems), en la base de datos Geneloc, y los descritos previamente para los distintos *loci*. A continuación, se muestran los marcadores empleados, el fluorocromo empleado, la distancia en centiMorgans (cM), la secuencia de los oligos y los tamaños de amplicón esperado, así como las condiciones de amplificación que fueron las mismas para todos los marcadores empleados (*tabla 3.46-3.51*).

MICROSATÉLITES ADYACENTES AL GEN <i>TBX5</i>				
MARCADOR	FLUOROCROMO	DISTANCIA (cM)	SECUENCIA DE CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN
D12S129	VIC	0,1 cM anterior	F: 5'- ATGTGTGTGTTTTTCCCAAGG-3' R: 5'- CAGCATCTTCATGCCACG-3'	159 pb-194 pb
D12S1646	6-FAM	intragénico	F: 5'- ACCACTCCATTGCTGGC-3' R: 5'- GCTGGGTAAGAACCTCTGC-3'	217 pb-259 pb
D12S1341	VIC	0,2 cM posterior	F: 5'- TACTTGGGTGGCCGAG-3' R: 5'- ATGAAGCCTGTGCTTCT-3'	185 pb-221 pb
D12S354	6-FAM	0,3 cM posterior	F: 5'- GGTGGTTCTGGGTCAGAT-3' R: 5'- GGTTTCCTAATTCAAGTCAA-3'	187 pb-205 pb

Tabla 3.46. *Microsatélites adyacentes al gen TBX5 obtenidos de la fuente de datos Geneloc.*

MICROSATÉLITES ADYACENTES AL GEN <i>FBN1</i>				
MARCADOR	FLUOROCROMO	DISTANCIA (cM)	SECUENCIA DE CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN
D15S119	6-FAM	0,8 cM anterior	F: 5'- ACTTTTGTGCCATTAGAGATT-3' R: 5'- AACAGAAAATCCGTAACATAACATA-3'	185 pb-197 pb
D15S126	NED	0,6 cM anterior	F: 5'- GTGAGCCAAGATGGCACTAC-3' R: 5'- GCCAGCAATAATGGAAGTT-3'	188 pb-218 pb
D15S1028	VIC	0,3 cM anterior	F: 5'- GAACTGTGCTCTGTGCTC-3' R: 5'- TGTCTGAAATCCCAAC-3'	187 pb
MTS-1	6-FAM	intragénico	F: 5'- CAACAAAGAAGGAGAAACAG-3' R: 5'- GACAATGTATTCAGAGGC-3'	128 pb-146 pb
MTS-2	6-FAM	intragénico	F: 5'- GTAGTTGTTATCTTGCAGA-3' R: 5'- CTGCCCTCTAGGACTCTAAG-3'	137 pb-165 pb
MTS-3	NED	intragénico	F: 5'- GAGTACATAGAGTGTTTAGGG-3' R: 5'- CCTGGCTACCATTCAACTCCC-3'	192 pb-197 pb
MTS-4	NED	intragénico	F: 5'- GATGTCCTATTGCCATCACCAC-3' R: 5'- CCTGTGCAGGGTAAGACAAG-3'	112 pb-128 pb
D15S143	PET	0,8 cM posterior	F: 5'- CTAAGGAGGCAACAGCAAAG-3' R: 5'- ATGTAAAGACTGGTATCTGTAGCAC-3'	196 pb

Tabla 3.47. *Microsatélites adyacentes al gen FBN1 descritos previamente por en 2001 (Judge, et al., 2001).*

MICROSATÉLITES ADYACENTES AL GEN <i>TYR</i>				
MARCADOR	FLUOROCROMO	DISTANCIA (cM)	SECUENCIA DE CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN
D11S1780	VIC	1,2 cM anterior	F: 5'- GGGATCTGCAGCAATTACT-3' R: 5'- GTATGCCACTAAACAACCTGTAGTCA-3'	173 pb-191 pb
D11S1367	6-FAM	0,2 cM anterior	F: 5'- GCTGACATTATTCACATGGC -3' R: 5'- ACAGTGTATCTCCCTGGCA-3'	224 pb-244 pb
D11S1358	VIC	1,4 cM posterior	F: 5'- ACAACCTGGATGAACCC-3' R: 5'- ACTTCTGTCTTTATGATTTTGATT-3'	138 pb-146 pb
D11S1974	PET	1,4 cM posterior	F: 5'- AGTAATAGTAGTCGTAGGTTGGAGC-3' R: 5'- CCCAACTTAACTGTTACAACATT-3' R: 5'- CCCAACTTAACTGTTACAACATT-3'	116 pb-127 pb
D11S1342	VIC	1,4 cM posterior	F: 5'- GGGACAGGAATACTACTACCCAAT-3' R: 5'- GACCCCTGGTATAGGACATT-3'	257 pb-267 pb

Tabla 3.48. Microsatélites adyacentes al gen *TYR* descritos previamente en 2001 (Couptry et al., 2001).

MICROSATÉLITES ADYACENTES AL GEN <i>GPR143</i>				
MARCADOR	FLUOROCROMO	DISTANCIA (cM)	SECUENCIA DE CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN
OA1-CA	6-FAM	intragénico	F: 5'- CTGCACCAGGGAGAGACTAAC-3' R: 5'- GGATAGGGAAGGGATTTCAGC-3'	150 pb

Tabla 3.49. Microsatélites adyacentes al gen *GPR143* descritos previamente en 1995 (Schiaffino et al., 1995).

MICROSATÉLITES ADYACENTES AL GEN <i>SALL1</i>				
MARCADOR	FLUOROCROMO	DISTANCIA (cM)	SECUENCIA DE CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLIFICACIÓN
D16S747	NED	0,11 cM anterior	F: 5'- ATAAAATTAGAGACAGACACAAGGG-3' R: 5'- GGCAGCCATTAGCTTCACT-3'	271 pb
D16S2875	6-FAM	0,015 cM anterior	F: 5'- TCCCTTCTGTTGAGAAATGCTCTC-3' R: 5'- CCGCAGACATTCTTTGTCTGG-3'	169 pb
D16S3396	NED	0,022 cM posterior	F: 5'- AGAAGATTCATTGGACCCA-3' R: 5'- CAGAAAATGGAGGTAGCAA-3'	138 pb-157 pb
D16S2996	PET	0,022 cM posterior	F: 5'- ATAAAAATAAGATTGCTACCTCC-3' R: 5'- CGAATGATTATTACCTTCATTAGC-3'	174 pb-175 pb

Tabla 3.50. Microsatélites adyacentes al gen *SALL1* obtenidos de la fuente de datos Geneloc.

Condiciones de amplificación de los microsatélites				
Reactivos			CICLOS (n=35)	
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen	Temperatura	Tiempo
Tampón con MgCl ₂	10X + 2mM	2 µl	95°C	5 min
dNTPs (Invitrogen)	1,25 mM	3,2 µl	95°C	20 s
Cebadores F/R (Pacisa-Giralt)	10pmol/µl	1 µl / 1 µl	55°C	20 s
ADN	50 ng/µl	2 µl	72°C	40 s
FastStart Taq Polimerasa (Roche)	5U/µl	0'2 µl	72°C	7 min
Agua estéril (Braun)		6,6 µl	4°C	∞

Tabla 3.51. Condiciones de PCR para la amplificación de los microsatélites.

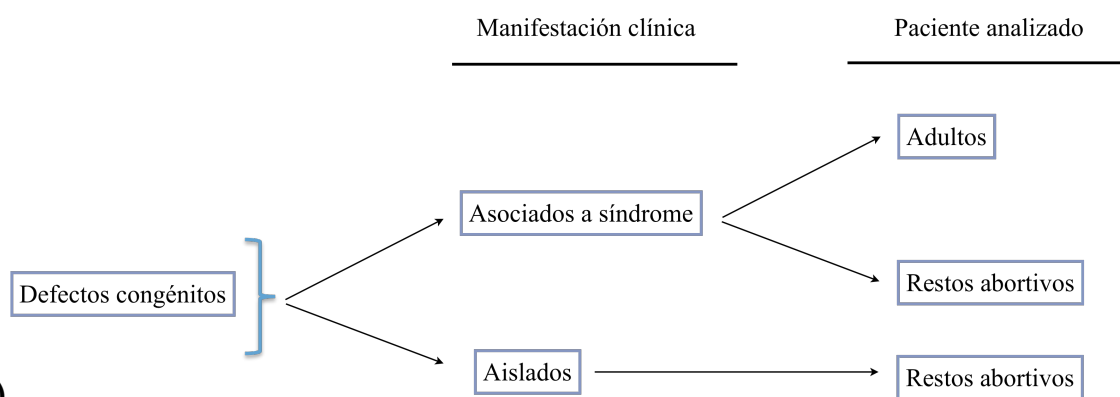
3.2.5 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

-Albinism Database	http://albinismdb.med.umn.edu/
-Center of Applied Genomics	http://www.tcag.ca/
-Clinical Trials	http://clinicaltrials.gov/
-Decipher	http://decipher.sanger.ac.uk/
-EMQN	http://www.emqn.org/
-Ensembl:	http://ensembl.org
-Encode	http://genome.ucsc.edu/ENCODE/
-Geneloc Home	http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc/
-HGNC	http://www.genenames.org/
-HGMD:	http://www.hgmd.org/
-LOVD	http://www.lovd.nl/2.0
-MRC-Holland	http://www.mlpa.com
-NCBI:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
-Phenomizer	http://compbio.charite.de/phenomizer
-Polyphen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/
-Primers3	http://frodo.wi.mit.edu/
-PDB: Protein database	http://www.pdb.org/
-Proyecto Hope	http://www.cmbi.ru.nl/hope/home
-Proyecto 1000 genomas	http://www.1000genomes.org/
-SIFT	http://sift.jcvi.org/
-TBX5 Mutation Database	http://www.uni-leipzig.de/~genetik/TBX5
-UniProt	http://www.uniprot.org/
-UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu

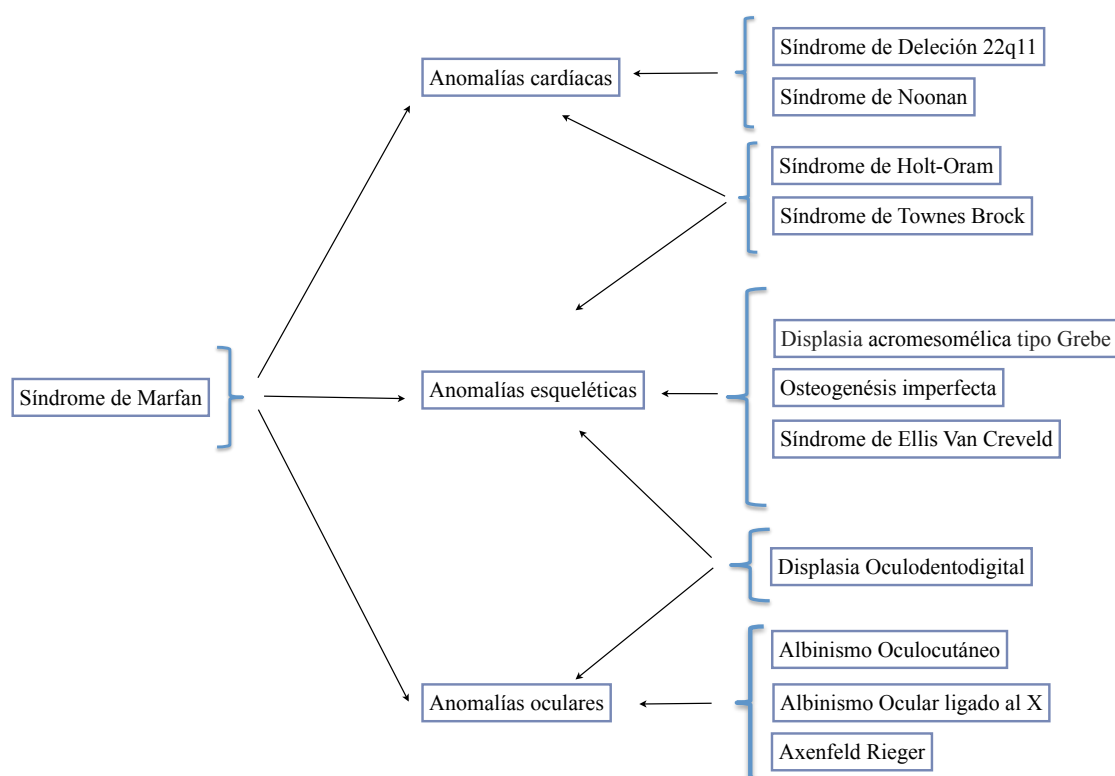
3.3 ESQUEMAS GENERALES

3.3.1 Esquemas general de la selección de patologías

a)

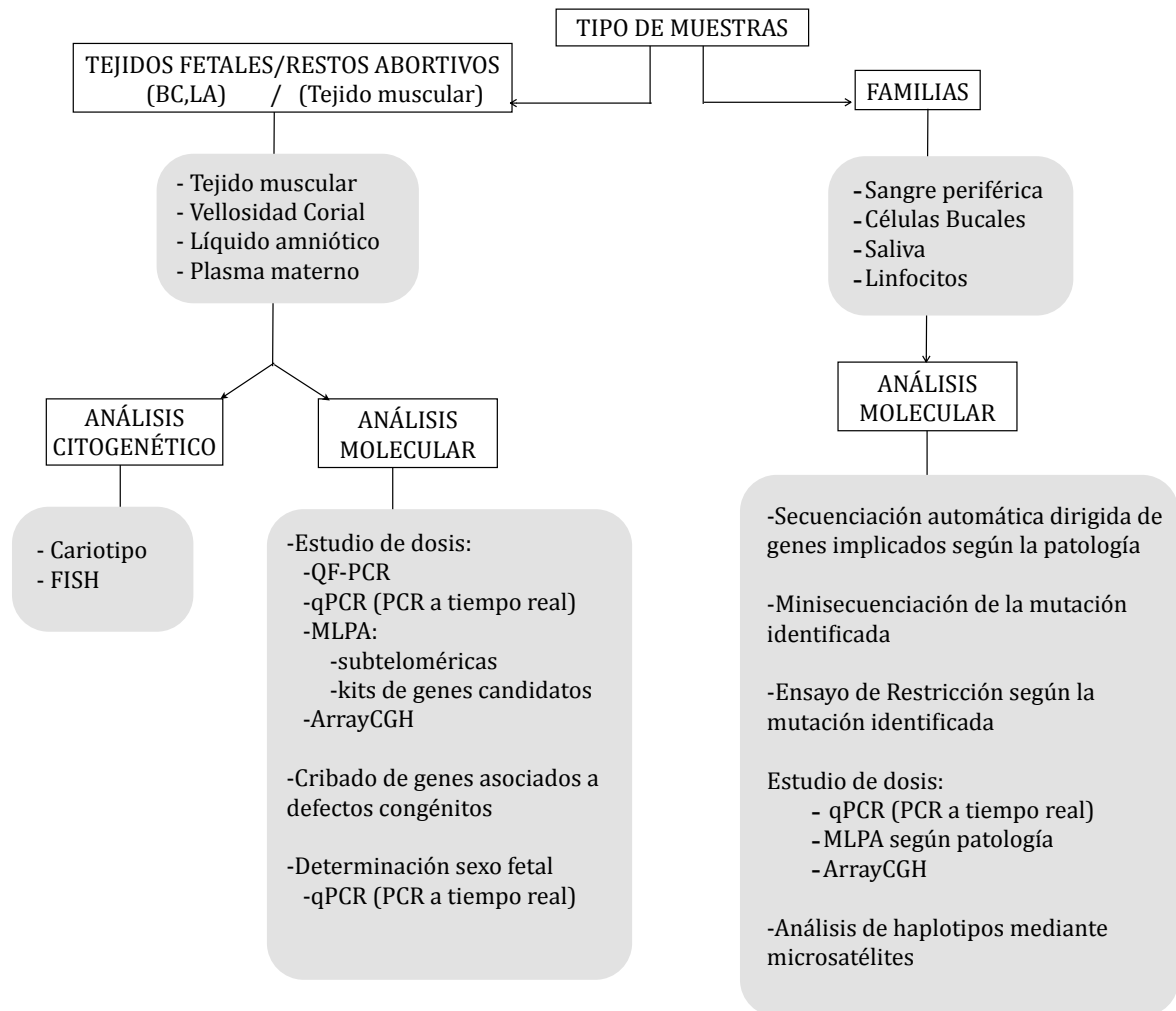


b)



Esquema 2.1. Relación de patologías y pacientes estudiados. a) Pacientes estudiados según si la anomalía congénita es aislada o asociada a síndrome b) Anomalías cardíacas, esqueléticas y oculares asociadas a síndromes analizadas en este estudio.

3.3.2 Esquema del tipo de muestra y metodología aplicada



Esquema 2.2. Técnicas citogenéticas y moleculares empleadas según la muestra biológica de partida.

3.3.3 Esquema de defectos congénitos, regiones y pacientes analizados y análisis aplicados

PATOLOGÍA	LOCUS	GEN O REGIÓN ESTUDIADA	PACIENTE ANALIZADO	ANÁLISIS
Deleción 22q11	22q11.2	22q11 Gen <i>TBX1</i>	Adultos Fetos (DP y Restos abortivos)	Citogenético y molecular
Sd. de Noonan	12q24.1 (<i>PTPN11</i>)	Gen <i>PTPN11</i>	Fetos (Restos abortivos)	Citogenético y molecular
Sd. de Marfan	15q21	Gen <i>FBNI</i>	Adultos Fetos (DGP)	Molecular
Ellis van Creveld	4p16	Gen <i>EVC</i> y <i>EVC2</i>	Fetos (DP y Restos abortivos)	Molecular
Displasia acromesomélica tipo Grebe	20q11.22	Gen <i>CDMP1</i>	Adultos (segregación) Fetos (DP)	Molecular
Displasia oculodentodigital	6q22-6q24	Gen <i>GJA1</i>	Adultos	Molecular
Osteogenesis Imperfecta	7q22.1 (<i>COL1A1</i>) 17q21.3 (<i>COL1A2</i>)	Gen <i>COL1A1</i> y <i>COL1A2</i>	Fetos (DP y Restos abortivos)	Molecular
Sd. de Holt-Oram	12q24	Gen <i>TBX5</i>	Adultos Fetos (DP)	Molecular
Sd. de Townes Brock	16q12.1	Gen <i>SALL1</i>	Adultos	Molecular
Holoprosencefalia	7q36	Gen <i>SHH</i>	Fetos	Citogenético y molecular
Albinismo Oculocutáneo tipo 1 (OCA1) y tipo 2 (OCA2)	11q14.3 (<i>TYR</i>) 15q11.2-q12 (<i>OCA2</i>)	OCA1: Gen <i>TYR</i> OCA2: Gen <i>OCA2</i>	Adultos	Molecular
Albinismo Ocular tipo 1 (OA1)	Xp22.3	OA1: Gen <i>GPR143</i>	Adultos Fetos (DPNI)	Molecular
Sd. de Axenferd Rieger	4q21 (<i>PITX2</i>) 6p25 (<i>FOXC1</i>)	Genes: <i>PITX2</i> , <i>FOXC1</i> <i>SOX2</i> , <i>OTX2</i> , <i>BMP4</i>	Adultos 4q21 (<i>PITX2</i>) 6p25 (<i>FOXC1</i>)	Molecular

Esquema 2.3. Esquema de las patologías, el locus génico, los genes, los paciente estudiadas y las técnicas empleadas en cada caso.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MALFORMACIONES CONGÉNITAS EN ABORTOS

4.1.1. RESULTADOS GENERALES

De todos los restos abortivos referidos al servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz durante el periodo de investigación de esta tesis, se analizaron 43 casos diferidos desde el servicio de Ginecología y Obstetricia de la Fundación Jiménez Díaz, así como, de clínicas abortivas privadas, por presentar malformaciones congénitas múltiples o aisladas como: cardiopatía estructural, anomalías esqueléticas de miembros superiores y/o inferiores, holoprosencefalia u otras alteraciones craneofaciales.

Del total de 43 fetos analizados, se caracterizaron:

- 13 casos con aneuploidías o poliploidías, detectadas por QF-PCR o Cariotipo.
- 1 caso con anomalías cromosómicas detectadas por MLPA.
- 3 casos con CNVs no descritas por array CGH.
- 3 casos con mutaciones puntuales.

A continuación, se presenta una tabla resumen de los casos analizados en este estudio y los resultados de las diferentes técnicas empleadas en cada caso (*tabla 4.1*), así como la fracción de los casos caracterizados en función de la alteración y las semanas de gestación (*figura 4.1*). Los datos clínicos de referencia se han recogido en la tabla 3.1 (*ver sección pacientes y métodos*).

En primer lugar, con independencia de la sospecha clínica inicial, se realizó el estudio de aneuploidías mediante **cariotipo** y **QF-PCR**, ya que las aneuploidias son la principal anomalía cromosómica y la principal causa de abortos espontáneos, así como de defectos congénitos. La mayoría de las aneuploidias derivan de errores en la meiosis I materna, donde la edad materna es un factor de riesgo de la mayoría de trisomías y alteraciones en la recombinación, siendo el principal contribuyente a la no disyunción meiótica (Hassold, *et al.*, 2007).

CASOS	QF-PCR	CARIOTIPO	MLPA	ARRAYS	GENES ANALIZADOS
AB-446	XY Normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p250: negativo Salsas p179 y p180: negativo Salsa P029: negativo	N/D	<i>TBX5</i> : negativo
AB-1054	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p250: negativo Salsas p179 y p180: negativo Salsa P029: negativo	Array CGH Agilent 400K (figura 4.20)	<i>TBX5</i> : negativo
AB-1081	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p250: negativo Salsas p179 y p180: negativo Salsa P029: negativo	N/D	<i>TBX1</i> : negativo
AB-1123	XX normal	46,XX	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p250: negativo	Array CGH Agilent 400K (figura 4.21)	N/D
AB-1138	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p080: negativo Salsa p187: negativo	N/D	<i>SHH</i> negativo
AB-1140	XY normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p080: negativo Salsa p187: negativo	N/D	<i>SHH</i> negativo
AB-1142	XX normal	46,XX	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p080: negativo Salsa p187: negativo	N/D	<i>SHH</i> negativo
AB-1160	N/A	46,XY r(10)	Salsas p036 y p070: deleción de las regiones subteloméricas de 10p y 10q	N/D	N/A
AB-1162	XY,+18	N/D	N/A	N/D	N/A
AB-1180	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p250: negativo Salsas p179 y p180: negativo Salsa P029: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo <i>TBX5</i> : negativo
AB-1212	XY Normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo	N/D	Mutación en el gen <i>COL1A1</i>
AB-1234	N/A	69,XXY	N/A	N/A	N/A
AB-1239	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p250: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo
AB-1241		47,XY,+9	N/A	N/D	
AB-1242	XY Normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p250: negativo Salsas p179 y p180: negativo Salsa P029: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo <i>TBX5</i> : negativo
AB-1256	XY Normal	N/D	Salsas p036 y p070: deleción de las regiones subteloméricas de "21p" y 21q	Array CGH: Monosomía 21	N/A
AB-1281	X	N/D	N/A	N/D	N/A
AB-1283	X	N/D	N/A	N/D	N/A

AB-1289	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo	N/D	N/D
AB-1327	N/A	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p080: negativo Salsa p187: negativo	N/D	N/D
AB-1330	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo
AB-1345	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo
AB-1362	XX,+15	N/D	N/A	N/D	N/A
AB-1373	XY,+13	N/D	N/A	N/D	N/A
AB-1379	XX normal	N/D	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsas p179 y p180: negativo	Array CGH Agilent 400K (figura 4.22)	<i>TBX5</i> : negativo
AB-1404	N/A	69,XXX	N/A	N/D	N/A
AB-1432	XX Normal	46,XX	Salsas p036 y p070: negativo	N/D	N/D
AB-1438	XY Normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsas p179 y p180: negativo	Array CGH Agilent 400K (figura 4.23)	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo
AB-1459	XY Normal	N/A	Salsas p036 y p070: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo
AB-1484	XY,+21	N/D	N/A	N/D	N/A
AB-1501	Triploide XXY	N/D	N/A	N/D	N/A
AB-1505	N/A	47,XX,+9	N/A	N/D	N/A
AB-1509	XY Normal	46 XY	Salsas p036 y p070: negativo	Array CGH Agilent 400K (figura 4.24)	N/A
AB-1517	XX normal	46 XX	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsa p080: negativo Salsa p187: negativo	N/D	<i>SHH</i> : negativo
AB-1529	XY normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsas p179 y p180: negativo	Array CGH Agilent 400K (figura 4.25)	N/A
AB-1544	XX normal	46,XX	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsas p179 y p180: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo
AB-1577	XX normal	N/A	Salsas p036 y p070: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo
AB-1687	XY Normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo	N/A	Mutación en el gen <i>COL1A1</i>
AB-1755	XX normal	46,XX	Salsas p036 y p070: negativo	N/D	N/D
AB-1889	N/A	N/D	N/A	N/A	Mutación en el gen <i>EVC2</i>
AB-2018	XY normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo Salsa p245: negativo Salsas p179 y p180: negativo	N/D	<i>PTPN11</i> : negativo <i>TBX1</i> : negativo <i>TBX5</i> : negativo
AB-2019	XX,+18	N/D	N/A	N/D	
AB-2036	XY Normal	46,XY	Salsas p036 y p070: negativo	N/D	<i>TBX5</i> : negativo

Tabla 4.1. Restos abortivos analizados por las diferentes técnicas citogenéticas y moleculares, así como los resultados de las mismas. Lo individuos en azul muestran los individuos caracterizados.

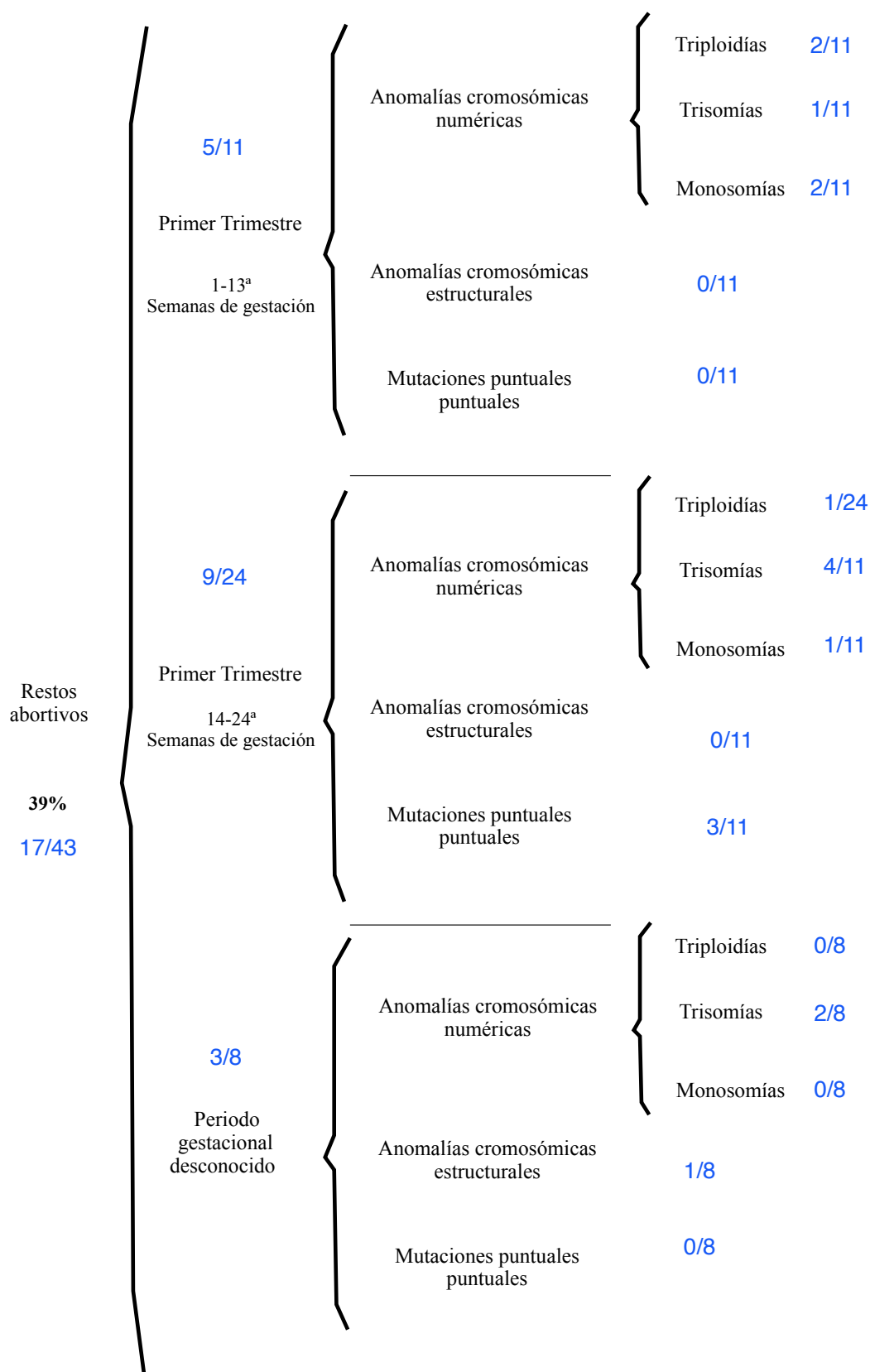


Figura 4.1. Fracción de restos abortivos caracterizados, diferenciados por el tipo de alteración identificada y las semanas de gestación de cada aborto.

Como cabría esperar, la mayoría de los casos caracterizados fueron aneuploidías, puesto que tal y como se ha comentado anteriormente, las anomalías cromosómicas son la principal causa de las malformaciones congénitas. De acuerdo con lo descrito en la literatura, alrededor del 65% de los abortos espontáneos del primer trimestre presentan anomalías cromosómicas (Hassold *et al.*, 1980), siendo principalmente anomalías cromosómicas numéricas, tales como trisomías de los autosomas (29%), monosomía del cromosoma X (10%) y mosaicismo o anomalías cromosómicas estructurales (2%) (Hassold, 1986; Kalousek *et al.*, 1993). Este porcentaje podría ser superior, debido a que existe una tasa de fallo del cultivo celular del 10-40%; esta variación del porcentaje dependen del estado de maceración de la muestra, y del crecimiento selectivo de las células maternas empleada en el estudio (Lomax *et al.*, 2000).

Sin embargo, al contrario de lo publicado hasta ahora, en este estudio se detectaron mayor número de triploidías que trisomías en los fetos de primer trimestre de gestación (Hassold, 1986). Este resultado puede ser debido a que se realizó una selección de casos que presentaban malformaciones cardíacas, esqueléticas u craneofaciales y se descartaron la mayoría de los abortos espontáneos del primer trimestre de gestación, que no tenían indicación morfológica. Además, dos de los ocho casos que no presentaron especificación de las semanas de gestación (*figura 4.1*), fueron trisomías, que podrían pertenecer a un trimestre u otro de gestación, lo que modificaría el ratio de trisomías versus poliploidías sobre todo, en el primer trimestre, donde el ratio sería de 3:2 en lugar del actual 1:2, considerando que ambos casos fueran del mismo trimestre. En este supuesto, el número de trisomías sería superior al de triploidías, equiparándose a lo publicado con anterioridad (Hassold, 1986; Kalousek *et al.*, 1993).

Dado que estas malformaciones son más claras en fetos de semanas de gestación más avanzadas, en este estudio el número de casos de segundo trimestre fue aproximadamente, el doble con respecto a los abortos del trimestre de gestación (*figura 4.1*).

Las anomalías cromosómicas detectadas en segundo trimestre en este estudio, abarcaron menores regiones genómicas que en el primero (*figura 4.2.*), es decir, se detectaron trisomías o monosomías, en mayor proporción que triploidías. Esto puede explicarse por la elevada letalidad de las aneuploidías como respuesta evolutiva a la eliminación de cigotos defectuosos (Hook, 1983).

Además, en algunos casos de este estudio, se llegaron a identificar alteraciones en el genoma, tan mínimas como son las mutaciones puntuales en regiones codificantes. Estos hallazgos fueron posibles, debido a que presentaron una descripción clínica muy detallada y a la estrecha colaboración establecida con clínicos expertos de diferentes disciplinas, que permitió establecer un diagnóstico clínico más preciso, convirtiendo una descripción general como displasia esquelética, cardiopatía o polimalformación, en un determinado síndrome, lo que acotó la secuenciación a solo aquellos genes responsables de dicho síndrome y por ende, se llegó a identificar la mutación causal.

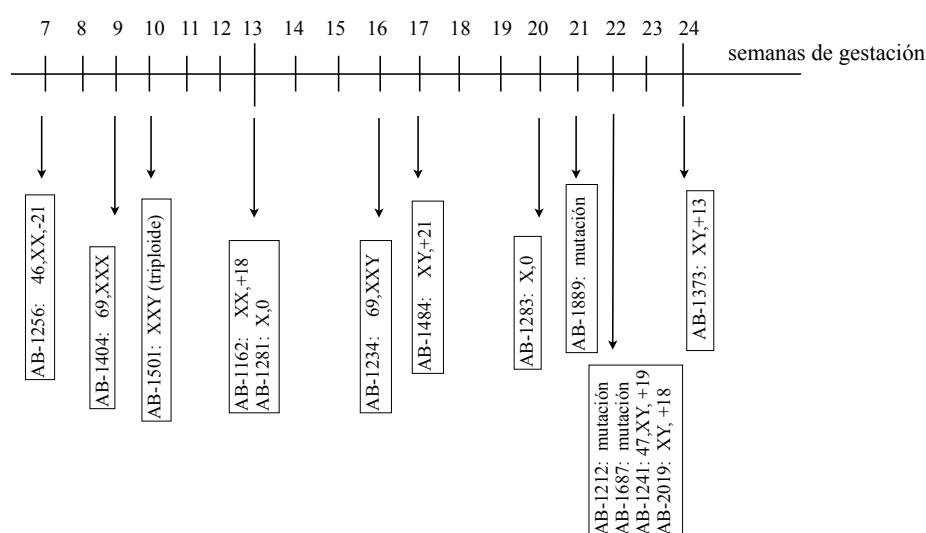


Figura 4.2. Representación esquemática de los restos abortivos caracterizados en este estudio, indicando el resultado de cada caso y presentados en función de las semanas de gestación en las que fueron referidos.

Aunque se ha reportado que la frecuencia de mutaciones puntuales en fetos malformados se encuentra entorno al 7-8% (Eurocat central Registry, 2004), se ha de tener en cuenta que, en la mayoría de los estudios de restos abortivos se realiza únicamente un cribado de aneuploidías y pocos estudios se centran en analizar genes implicados en malformaciones y de aquellos que secuencian genes, la mayoría parten de descripciones clínicas generales.

Esto puede sugerir que la frecuencia de mutaciones puntuales en fetos malformados pudiera ser superior al 7-8% reportado, pudiendo explicar así, parte del porcentaje de las malformaciones congénitas con etiología desconocida. De este resultado, se destaca que la obtención de resultados positivos mediante secuenciación Sanger, depende de la descripción clínica. No obstante, es posible que el incremento del empleo de plataformas genómicas en la rutina diagnóstica permita aumentar el porcentaje de casos caracterizados, ya que la secuenciación Sanger resulta en ocasiones, tediosa e infructuosa, a menos que se realice una evaluación exhaustiva del caso, aportando la máxima información clínica posible, para la realización de los subsecuentes análisis moleculares.

El **cariotipo** está considerada como la prueba de referencia (*gold standard*) del diagnóstico citogenético ya que es una técnica robusta, económica y fiable (Seabright, 1971), que permite el análisis global genómico, tanto del número como de la estructura cromosómica. Sin embargo, las principales limitaciones de dicha técnica son: a) la resolución de la misma, ya que la detección de las alteraciones requiere que los reordenamientos impliquen las citobandas, es decir, regiones de 3 a 5 Mb y b) la incapacidad de realización del análisis en ausencia de división celular (Yunis, 1976), donde hay que tener en cuenta que los resultados de esta técnica dependen del progreso del cultivo celular, que a su vez depende del estado de la muestra de partida, ya que una muestra macerada no crece adecuadamente.

Se ha reportado que en un 10-40% de los casos existe un fallo del cultivo (Lomax *et al.*, 2000). En estos casos, a pesar de que puede existir sospecha de la presencia de anomalías cromosómicas, muchos fetos con anomalías cromosómica múltiples presentan cariotipo normal y las causas subyacentes a los defectos congénitos de dicho fetos permanecen sin detectar. Otras de las limitaciones también referentes al cultivo son, la susceptibilidad a la contaminación materna o que aparezcan errores derivados del cultivo celular. Por otro lado, la interpretación de los resultados depende también, de un trabajo laborioso en el microscopio, que no permite su automatización (van den Berg *et al.*, 2012).

La técnica **FISH** es un método que se emplea, tanto en células en metafase como en interfase, para la detección de aneuploidías y síndromes de microdelección, mediante la hibridación de diferentes sondas marcadas con diferentes fluorocromos, donde cada una reconoce una determinada secuencia (Lengauer *et al.*, 1990).

La limitación principal es la necesidad de una sospecha clínica previa, para determinar la sonda a emplear y ésta, al ser específica de una región cromosómica concreta, no detecta alteraciones en otras regiones no hibridadas. La técnica FISH, aunque es más rápida que el cariotipo y tiene mayor sensibilidad para el análisis genético, por el elevado coste de las sondas que emplea y el tiempo de análisis que requiere en el microscopio, conllevan a que no sea la técnica por excelencia para un cribado rutinario de aneuploidias (van den Berg *et al.*, 2012). Por lo que para este propósito, en este estudio, fue sustituida por la QF-PCR.

La técnica **QF-PCR** es una técnica basada en el uso de varios microsatélites de determinados cromosomas, que permite conocer la semicuantificación de la dosis genómica de la región amplificada (Adinolfi *et al.*, 1997). Actualmente, se emplea para la detección de aneuploidías y poliploidías en el periodo prenatal, principalmente en los cromosomas 13, 18, 21, X o Y. Atendiendo al coste-efectividad, esta técnica resulta más económica que la técnica FISH en cuanto a la detección de aneuploidías y los resultados se obtienen con mayor rapidez. Las limitaciones son similares al FISH, es decir, que las alteraciones en regiones distintas a las analizadas no son detectadas (van den Berg *et al.*, 2012).

En los casos en los que falló el progreso del cultivo celular o en los que presentaban resultado normal, pero que pudieran presentar alteraciones no detectables mediante cariotipo y/o QF-PCR, se aplicó la técnica de MLPA empleando los kits p036 y p070 que contienen sondas para las regiones subteloméricas de todos los cromosomas, ya que pueden incrementar el porcentaje de detección de anomalías cromosómicas o incluso otros cromosomopatías involucradas en malformaciones fetales (Diego-Alvarez *et al.*, 2006). En los casos negativos, se realizó el estudio complementario mediante el empleo adicional de otros **MLPAs** teniendo en cuenta los datos clínicos de partida.

La técnica **MLPA** detecta la presencia o ausencia de grandes deleciones o duplicaciones de las regiones complementarias a las sondas hibridadas, previamente amplificadas en multiplex por PCR. El análisis se realiza mediante la comparación del electroferograma de la muestra problema con una muestra control. Existen diferentes kits comerciales con sondas que hibridan en diferentes regiones del genoma, en función de la sospecha clínica.

La limitación principal es que aquellas alteraciones en regiones distintas a las analizadas tampoco son detectadas por esta técnica. Tampoco son detectadas las poliploidías o aquellas alteraciones que no produzcan cambio en la dosis génica, tales como inversiones, translocaciones equilibradas, etc. Además, esta técnica es susceptible a la calidad y cantidad de ADN de partida.

En este estudio, el análisis, mediante el empleo de los kits de MLPA que abarcan regiones subteloméricas, no arrojó mayor información que la obtenida previamente por cariotipo y QF-PCR, en la mayoría de los casos (*tabla 4.1*), salvo para el caso de la monosomía 21 y el anillo del cromosoma 10 (*ver más detalle en pág. 159 y pág. 163*). En cuanto al resto de los kits empleados en función de la sospecha clínica inicial, tampoco se obtuvieron resultados positivos.

Estos kits pueden ser de utilidad cuando la sospecha clínica es clara, de otra forma, resulta infructuoso e ineficiente y aumenta mucho los costes asociados, al emplearlos como parte del cribado de síndromes concretos. Ante un feto sin sospecha clínica específica, se suelen emplear más de un panel para el descarte entre otros, de síndromes de microdelección, o síndromes que intervienen en la manifestación de algunos de los signos que presente el feto. Asimismo, a efectos de cobertura, el MLPA solo abarca regiones específicas de locus y en el caso de que las alteraciones abarquen otras regiones exteriores a las regiones analizadas, éstas no serían detectadas. No obstante, aunque esta técnica no resulta eficiente como cribado general ante sospechas clínicas generales, puede resultar efectiva como descarte de deleciones en las regiones codificantes analizadas, siendo esto óptimo en los casos en los que haya una sospecha clínica detallada que oriente el diagnóstico de una manera más precisa.

La calidad de la extracción de ADN de algunos casos no fue idónea, debido al estado de maceración de los restos abortivos y en otros casos, debido a que la muestra fue previamente fijada en formol y embebida en parafina. Todo esto pudo haber contribuido a interferir en la buena conservación del material genético y por tanto, en la resolución de los resultados de esta técnica. En otros casos, las muestras habían sido previamente extraídas anterior a su remisión al servicio de genética, de tal manera que no se pudo comparar con ADNs control extraídos de la misma forma y por tanto, esto compromete los resultados del análisis de MLPA.

Por otro lado, los resultados de MLPA a partir de ADNs procedentes de tejidos anejos fetales, como las vellosidades coriales, no fueron reproducibles en este estudio, posiblemente por la interacción del tampón empleado por el biorobot EZ1 con algunos de los tampones empleados en la técnica de MLPA. Además, los resultados de MLPA, empleando ADN extraído directamente de líquido amniótico sin cultivar, fueron no concluyentes. En la literatura, en la mayoría de los estudios en los que se obtienen resultados validados mediante MLPA a partir de vellosidades coriales o líquido amniótico, emplean ADN extraído a partir de el cultivo celular de dichas muestras (Kooper *et al.*, 2008a; 2008b). Sin embargo, tampoco tendrían resultados en el caso de que el cultivo celular no progresara.

A partir del 2012, los protocolos de MLPA advierten sobre evitar el empleo de ADN extraído por el biorobot EZ1 para el empleo de dicha técnica. Este tipo de extracción se llevó a cabo desde 2007 hasta el 2009 en el presente estudio, por lo que estos resultados se pudieron ver afectados por el uso de este método como extracción. Además, debido a que la mayoría de las muestras fueron sometidas a diferentes análisis, el sometimiento de las muestras a sucesivas congelaciones y descongelaciones, posiblemente pudo mermar la calidad de ADN y afectar, como consecuencia de ello, a los resultados.

Se seleccionaron 7 abortos que presentaban malformación de miembros, para su estudio mediante **microarray** 400k, a fin de determinar la presencia de CNVs que pudieran explicar los diferentes fenotipos en cada caso. Las CNVs identificadas mediante **array CGH** (*ver más detalle en pág. 164*), no fueron descritas previamente y tampoco se publicaron casos relacionados, por lo que sería necesario un mayor análisis para confirmar su implicación en dicho fenotipo. Este es uno de los riesgos de emplear estas técnicas, en casos donde las características clínicas de inicio son detalladas pobremente, puesto que la comunicación al paciente de las mismas resulta complicada debido a que no se conoce la implicación real de las mismas. Una de las principales limitaciones en este estudio, fue la falta de accesibilidad a las muestras parentales, que son indispensables para la interpretación de los resultados de los CGH arrays. En base a la experiencia adquirida durante este periodo de investigación, se ha observado que los padres de un aborto, suelen pasar por una experiencia traumática, que en ocasiones necesitan olvidar, y la solicitud de dichas muestras, días posteriores a la intervención, suele resultar compleja.

El análisis del genoma completo, con una elevada resolución, es costoso económicamente y es probable que detecte desequilibrios genómicos de significado incierto. Asimismo, no se pueden detectar anomalías cromosómicas equilibradas como translocaciones, inversiones o poliploidías (Shinawi & Cheung, 2008). Aunque el empleo de array CGH también presenta ventajas frente a otros métodos citogenéticos, como son la mayor resolución, la localización precisa de las anomalías, la automatización, su simplicidad y una mayor reproducibilidad de los resultados; no se requiere cultivo celular, por lo que el resultado se obtiene con mayor prontitud y la mayoría de plataformas de array CGH requieren poca cantidad (microgramos) de ADN genómico para su empleo. Además, en algunos casos se detectan, mediante esta técnica, desequilibrios cromosómicos adicionales a los obtenidos por aquellos métodos que se centran en un determinado locus y que solo proporcionan información de dicha región en concreto.

Posteriormente, se secuenciaron las regiones codificantes de genes asociados a defectos congénitos, tales como cardiopatías congénitas, anomalías de miembros u holoprosencefalia, que pudieran estar generando las malformaciones congénitas en cada caso.

En lo que respecta a la detección de mutaciones puntuales, mediante **secuenciación Sanger**, la caracterización de tres de los casos fue posible debido a la disponibilidad de toda la información clínica con detalle, a la incorporación de la información fotográfica y radiológica realizada en este estudio y a la estrecha colaboración multidisciplinar, de tal manera que se pudo establecer una estrategia molecular dirigida, mediante la cual se pudo identificar la mutación causal, en ambos casos. En los demás fetos, dada la falta de detalles en la indicación clínica, la dificultad del diagnóstico clínico de síndromes específicos en periodo prenatal o incluso, la inviabilidad del cribado genético de todos los genes relacionados con un determinado defecto congénito, se decidió realizar el estudio molecular de genes que pertenecían a ciertos síndromes que estaban relacionados con el desarrollo de miembros, cardíaco o craneofacial, tales como: *PTPN11*, *TBX1*, *TBX5*, *SHH* (ver más detalle en pág 173-177).

Sin embargo, en ninguno de éstos genes se detectó mutación alguna, por lo que es esperable que sean otros, los genes que puedan estar relacionados. Los genes *PTPN11*, *TBX1* y *TBX5*, están asociados a síndromes de herencia autosómica dominante y dada la falta de antecedentes familiares de estos síndromes, en el caso de que los fetos analizados hubieran presentado mutaciones se habría esperado que fueran mutaciones *de novo* (*ver más detalle sobre mutaciones de novo en pág. 183-184*).

Se conoce que las mutaciones *de novo* se suelen asociar a la elevada edad paterna (Veltman & Brunner, 2012), pudiendo ser la explicación del fenotipo en los casos AB-1239, cuyo padre presentaba 44 años de edad y AB-1330, cuyo padre tenía 59 años. Sin embargo, no se descartan las siguientes hipótesis: a) mutaciones en heterocigosis *de novo* en zonas reguladoras de estos genes b) mutaciones en heterocigosis *de novo* en otros genes que estén relacionados con síndromes autosómicos dominantes conocidos c) mutaciones en homocigosis o dos mutaciones en heterocigosis compuesta en genes relacionados con síndromes autosómicos recesivos conocidos d) la presencia de mutaciones en otros genes aún no caracterizados y que las nuevas tecnologías puedan revelar su implicación en la aparición de defectos congénitos en los fetos e) alteraciones epigenéticas.

Tampoco se descarta la presencia de teratógenos que puedan haber generado fenocopias, ya que, aunque en las últimas décadas, se ha proporcionado mayor información a las gestantes sobre los efectos teratogénicos, algunas embarazadas son conscientes de su estado de gestación, tras la falta del primer periodo menstrual, que es posterior al periodo de máxima susceptibilidad a teratógenos, que abarca de la 3ª a la 8ª semana de gestación, por lo que ciertos hábitos pueden ser perjudiciales para el desarrollo fetal. Por otro lado, ciertas ocupaciones laborales de los progenitores, hay que tenerlas presentes, puesto que existen ciertos productos químicos en el ambiente laboral que pueden afectar al desarrollo embrionario. Hoy en día, gracias al desarrollo por parte del Centro de Investigación de Anomalías Congénitas del Instituto de Salud Carlos III, del servicio de información telefónica para la embarazada (SITE) y el servicio de información telefónica sobre teratógenos español (SITTE), este último destinado a profesionales de la salud, se puede adquirir la información necesaria sobre los factores de riesgo en el desarrollo prenatal.

4.1.2. CRIBADO DE ANEUPLOIDIAS MEDIANTE CARIOTIPO, QFPCR Y/O MLPA

4.1.2.1. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS

Las aneuploidías más comunes son las aneuploidías autosómicas (~75%), seguido de las poliploidías (~13%), las anomalías de cromosomas sexuales (~8%) y las anomalías estructurales desequilibradas (~4%) (Hassold *et al.*, 1980).

A continuación, se muestran y discuten los resultados obtenidos de los abortos seleccionados para este estudio, diferenciándolos según la anomalía cromosómica o genética detectada.

4.1.2.1.1. TRIPLOIDÍAS:

En nuestra series, se detectaron triploidías en 3 casos de los 43 analizados:

- **AB-1234** muestra de feto de 16 semanas de gestación con indicación clínica de aborto polimalformado y una dotación genética 69,XXY.
- **AB-1404** muestra de feto de 9 semanas de gestación con indicación de feto malformado con regresión caudal y una dotación genética 69,XXX (*figura 4.3.*).

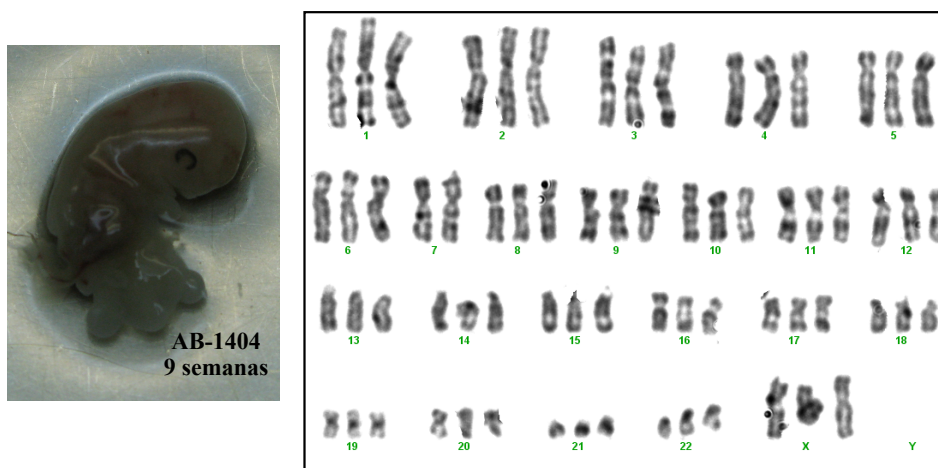


Figura 4.3. Fotografía del feto AB-1404 (imagen izquierda) y su cariotipo en el que se observa un resultado triploide (imagen derecha).

-AB-1501 muestra de feto de 10 semanas de gestación con sospecha clínica de sirenomelia y una dotación genética 69,XXY. *(La sirenomelia es una patología letal extremadamente rara con una frecuencia de 1/60 000 recién nacidos, donde los miembros inferiores se encuentran fusionados como producto de un trastorno severo en el desarrollo de la blastema caudal axil posterior, posiblemente debido a una alteración vascular de una rama de la arteria aorta abdominal. Puede manifestarse de forma aislada, asociada a trastornos renales, cardiovasculares, gastrointestinales, respiratorios, alteraciones del tubo neural, ausencia de genitales externos y arteria umbilical única o formando parte del síndrome de regresión caudal (Garrido-Allepuz et al., 2011). La etiología de este defecto es aún desconocida, aunque estudios en ratones han descubierto la existencia de una posible base genética, ya que la sirenomelia se produce en ratones con deficiencia en la enzima que degrada el ácido retinoico (Padmanabhan, 1998) y en ratones con déficit en la señalización de la proteína Bmp en la región caudal embrionaria (Zakin et al., 2005).*

Las triploidías son la anomalía más frecuente en los embarazos que normalmente culminan en aborto espontáneo en un periodo temprano de gestación (2-3%), pudiendo ser el resultado de una diginia (extra dotación haploide materna) o diandria (extra dotación haploide paterna).

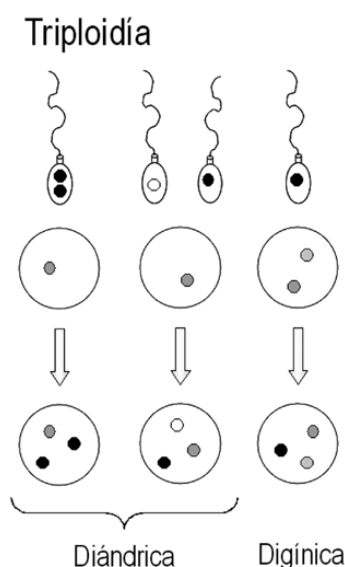


Figura 4.4. Ejemplo de una fecundación diándrica y digénica que dan como resultado una triploidía.

Se han observado dos fenotipos distintivos en fetos triploides, en función del origen parental de la triploidía (**figura 4.4.**). El fenotipo diándrico se caracteriza por un feto con tamaño normal con glándulas adrenales normales y asociado a una placenta quística con característica de mola hidatidiforme parcial. En cambio, el fenotipo digénico corresponde a una hipoplasia adrenal marcada, un crecimiento intrauterino asimétrico y una placenta pequeña no molar.

Además, los fetos triploides pueden presentar otras anomalías congénitas como sindactilia completa del tercer y cuarto dedo de los pies, anomalías genitales, cardíacas, urinarias, cerebrales que no difieren entre su origen digénico o diándrico (McFadden *et al.*, 1993). Las diferencias fenotípicas parece que no se deben a diferencias en el crecimiento y función placentarias, sino a un posible efecto directo de *imprinting* de algunos genes, cuyo efecto es dependiente del origen parental de la triploidía (McFadden & Robinson, 2006).

Los mecanismos de *imprinting* se establecen en la gastrulación (Reik *et al.*, 2001), que es en ese periodo gestacional donde las consecuencias de la triploidía se manifiestan, por lo que este dato refuerza la hipótesis de que sea éste, el mecanismo causal de las diferencias fenotípicas de los fetos triploides según el origen parental de la triploidía.

Dado que la triploidía surge debido a errores en la fecundación, el riesgo de recurrencia no es superior al de la población en general, por lo tanto, es un hecho esporádico y no es necesario en estos casos, ofrecer diagnósticos prenatales, salvo en situaciones de gran ansiedad materna.

Los tres casos presentados en este apartado, representan un ejemplo de la importancia de la realización del cariotipo independientemente de la indicación, ya que presentaban diagnósticos de sospecha diferentes teniendo la misma alteración cromosómica (triploidía). En la experiencia del laboratorio, se ha constatado que algunos fetos con indicación de displasia esquelética (sospecha de displasia tanatofórica) el resultado final ha sido de triploidía o de síndrome de Down. Este hecho, recalca que el protocolo de diagnostico debe comenzar por un cribado general de aneuploidias, sobre todo en fetos malformados detectados en primer trimestre de gestación, porque de otra forma, en fetos con sospecha de displasia esquelética se comienza con el estudio dirigido hacia el gen asociado a displasias tanatofóricas (gen *FGFR3*), obteniéndose resultados infructuosos con los consiguientes costes añadidos.

4.1.2.1.2. TRISOMÍAS:

Las trisomías de los cromosomas 21, 13 y 18 junto con las aneuploidias de los cromosomas sexuales abarcan del 60-80% de los cariotipos con resultado positivo en células de líquido amniótico. La frecuencia de las anomalías especificadas depende de la edad materna, ya que el riesgo de las mayoría de las trisomías, aumenta dramáticamente con el incremento de ésta, mientras que no se da esta correlación en la poliploidía o la monosomía de los cromosomas sexuales (Hassold & Chiu, 1985).

La mayoría de los defectos estructurales asociados a las aneuploidías pueden ser identificados ecográficamente. Las tres trisomías (13, 18 y 21) están asociadas a una elevada edad materna, translucencia nucal elevada y disminución de la PAPP-A, mientras que la β -hCG está aumentada en los fetos con trisomía 21 en comparación con los fetos con trisomías 13 y 18 en donde se encuentra disminuida (Nicolaidis, 2011). Por tanto, ante una sospecha ecográfica de aneuploidía es necesario su confirmación mediante cariotipo o QF-PCR. En este estudio se detectaron:

- Trisomía 21: en el caso AB-1484.
- Trisomía 18: en los casos AB-1162 y AB-2019.
- Trisomía 13: en el caso AB-1373.
- Trisomía 15: en el caso AB-1362.
- Trisomías 9: en los casos AB-1241 y AB-1505.

4.1.2.1.2.1 Trisomía 21 (Síndrome de Down)

-En la muestra **AB-1484** correspondiente a un feto de 17 semanas de gestación que presentaba hidrops fetal (*figura 4.5.*), se detectó mediante la técnica QF-PCR un patrón trisómico para los marcadores D21S1414 y D21S1411 y se observó un patrón masculino mediante los marcadores sexuales (*figura 4.6.*).



Figura 4.5. Fotografía y Radiografía del feto AB-1484.

(El hidrops fetal no inmune se caracteriza por la acumulación extracelular de líquido en tejidos y cavidades serosas, sin evidencia de anticuerpos circulantes contra los antígenos eritrocitarios. Las causas más frecuentes más son las anomalías cromosómicas, las infecciones y alteraciones cardiovasculares. En general, cuanto más hidrópico se encuentra el feto, mayor es la probabilidad de una anomalía cromosómica (Machin, 1989).

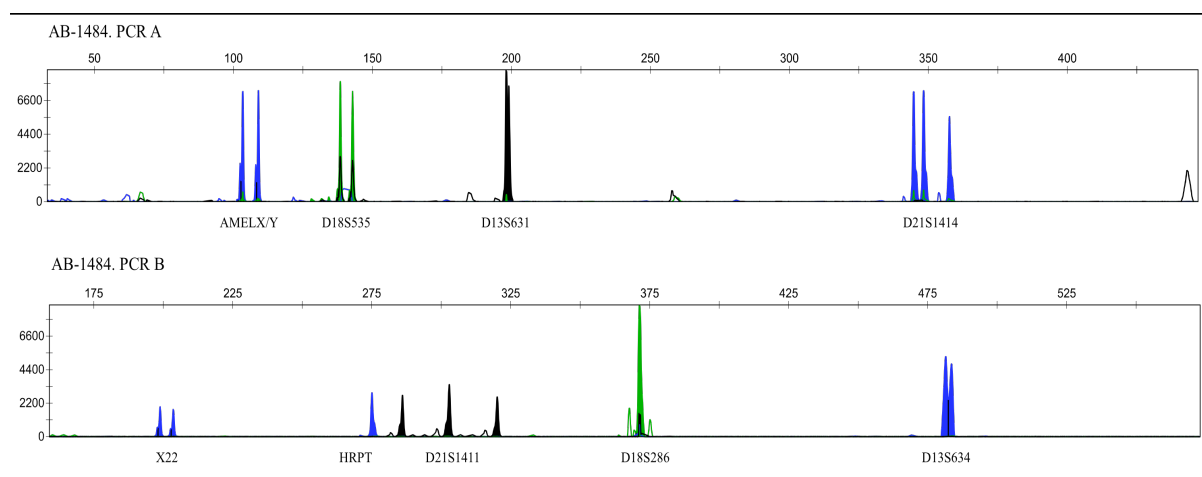


Figura 4.6. Resultados de *QF-PCR-A* y *QFPCR-B* donde se observan tres dosis para los marcadores del cromosoma 21.

La trisomía 21, también conocida como síndrome de Down (Down, 1995) cursa con bajo peso al nacer, talla corta, hipotonía, orejas de implantación baja, ojos rasgados, macroglosia, nariz chata y pequeña, surco palmar, clinodactilia y pie en sandalia. También presentan cardiopatías (la más típica el canal atrio-ventricular común), alteraciones digestivas (atresia duodenal), y otras anomalías como ventriculomegalia, hidropesía, mal posición de los pies. Además en individuos con este síndrome es común la aparición de leucemia, déficits en visión y audición, patología tiroidea, problemas inmunológicos o instauración precoz de demencia senil de tipo Alzheimer. Este síndrome fue descrito clínicamente por Langdon Down en 1959, cuando se establecieron las características clínicas asociadas a la presencia de un cromosoma acocéntrico extra (Lejeune *et al.*, 1959).

El análisis de marcadores bioquímicos gestacionales en el segundo trimestre, junto con la medición de la translucencia nuchal entre las 11 y 14 semanas de gestación, permitió aumentar la detección de aneuploidías del cromosoma 21, de un 60% de los fetos afectados por cada 660 nacidos vivos, detectados únicamente con el análisis bioquímico, al 80% al emplear ambos marcadores (Snijders *et al.*, 1998).

La trisomía 21 se considera la aneuploidía autosómica viable más frecuente en la especie humana y constituye la principal causa de deficiencia mental en la infancia (Jones, 2006).

Asimismo, representa la anomalía más frecuente en recién nacidos vivos con una prevalencia global de 1:600 nacimientos (Mutton *et al.*, 1998), aunque el riesgo varía con la edad de la madre. La incidencia en madres de 25 años es de 1 por 2.000 nacidos vivos, mientras que en madres de 35 años es de 1 por cada 200 nacimientos y de 1 por cada 40 en las mujeres mayores de 40 años (Nicolaidis, 2004). La dotación genómica extra de un cromosoma 21 completo sucede debido a errores en la meiosis, mayoritariamente de origen materno, que suceden con mayor frecuencia al aumentar la edad de la gestante. De ellos, aproximadamente un 80% ocurren durante la meiosis I y un 20% durante la meiosis II. Alrededor del 5% de los fallos de disyunción en la meiosis que originan la trisomía 21 son de origen paterno que no se correlacionan con la edad paterna (Penrose, 2009). La existencia de un hijo previo con síndrome de Down aumenta, en un 0,75%, la probabilidad de aparición de otro hijo con síndrome de Down en una gestación posterior (Hu *et al.*, 2005).

Se cree que el cromosoma 21 está compuesto de 200 a 250 genes, pero sólo un pequeño porcentaje de ellos se encuentra involucrado en producir las características del Síndrome de Down. Algunos de estos genes conocidos son:

-*SOD1* gen de la superóxido dismutasa: su sobreexpresión podría causar envejecimiento precoz e inmunodepresión.

-*COLGAI*: su sobreexpresión podría ser causa de malformaciones cardíacas.

-*ETS2*: su sobreexpresión podría ser causa de anomalías esqueléticas.

-*CAF1A*: su sobreexpresión podría disminuir la síntesis de ADN.

-*CBS*: su sobreexpresión podría alterar el metabolismo y reparación del ADN.

-*DYRK*: su sobreexpresión podría ser la causa del retraso mental.

-*CRYA1*: su sobreexpresión podría ser causa de cataratas.

-*GART*: su sobreexpresión podría interferir en la síntesis y reparación del ADN.

-*IFNAR*: su sobreexpresión podría interferir con el sistema inmunitario y con otros sistemas.

-Otros genes que se suponen implicados: *APP*, *GLURS*, *S100B*, *TAM*, *PFKL*

4.1.2.1.2.2 Trisomía 18 (Síndrome de Edwards)

En la muestra fetal AB-1162 y en la muestra AB-2019 (*figura 4.7*) se detectó mediante QF-PCR un patrón trisómico para los marcadores D18S535 y D18S386, localizados en el cromosoma 18, en ambas muestras (*figura 4.8*). Además, los marcadores de los cromosomas sexuales permitieron establecer que el AB-1162 correspondía a un feto masculino, mientras que el AB-2019 correspondía a un feto femenino.

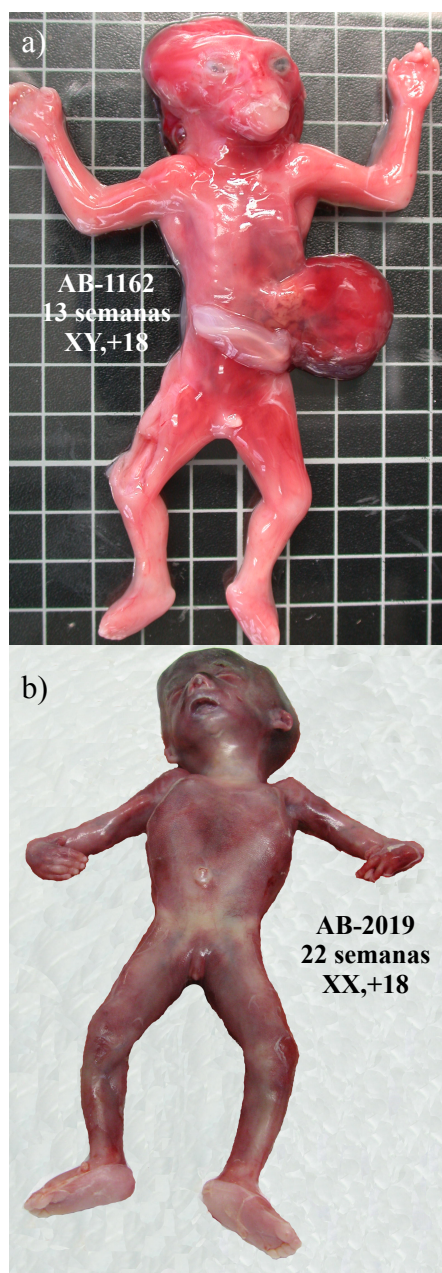


Figura 4.7. Fotografías de los casos:

a) AB-1162 y b) AB-2019.

-La muestra fetal **AB-1162** pertenecía a un feto de 13 semanas de gestación que presentaba la indicación de estudio de aneuploidias, dada la elevada edad materna en el periodo gestacional (39 años) y por presentar marcadores ecográficos alterados. La descripción clínica determinaba un feto acráneo con fisura palatina y gastrosquisis. *(El encefalocele y la anencefalia, junto con otros defectos de cierre del tubo neural, ocurren en forma aislada en más del 95 % de los casos, pero pueden formar parte de un cuadro de múltiples anomalías de origen monogénico, como el síndrome de Meckel Gruber, las trisomías 13 o 18, por efecto de teratógenos como aminopterina o ácido valproico, o fenotipos definidos de causa desconocida como el asociado con extrofia de cloaca (Holmes et al., 1976).*

-La muestra fetal **AB-2019** correspondía a un feto femenino de 22 semanas de gestación con arteria pulmonar dilatada, comunicación interventricular perimembranosa, ventriculomegalia derecha, acortamiento bilateral de miembros superiores (cúbito derecho corto, ausencia de cúbito izquierdo, focomelia izquierda hipoplasia de antebrazo derecho). *(Mas del 30% de fetos con trisomías 18 presentan anomalías de miembros (Yamanaka et al., 2006) y el 80% de los casos con trisomía 18 presentan anomalías congénitas cardíacas).*

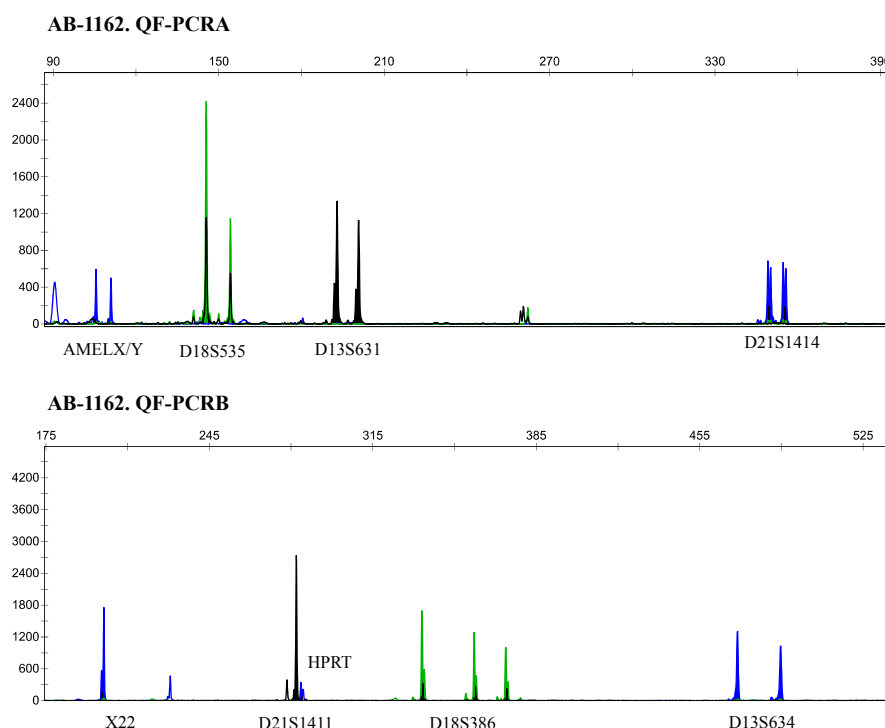


Figura 4.8. Resultados de la QF-PCRA y QF-PCRB del caso AB-1162.

La trisomía 18 es una anomalía cromosómica asociada al síndrome de Edwards descrito por primera vez en 1960, que presenta un patrón reconocible de defectos congénitos (Edwards *et al.*, 1960):

- Anomalías craneofaciales: microcefalia, occipucio prominente con diámetro bifrontal estrecho, fisuras palpebrales cortas, orejas displásicas de implantación baja, micrognatia.
- Anomalías cardiovasculares: comunicación interventricular con afectación valvular múltiple, conducto arterioso persistente.
- Malformaciones reno-urológicas: riñón en herradura retraso en el crecimiento pre- y postnatal, hipotonía inicial que evoluciona a hipertensión.
- Anomalías esqueléticas: esternón corto con núcleos de osificación reducidos en radiografía, mano característica con tendencia a puños cerrados, con el segundo dedo superpuesto al tercero y el quinto sobre el cuarto.

Esta manifestación fenotípica está ocasionada por la presencia de un cromosoma 18 adicional, ya sea parcial, completo, o en mosaico. La trisomía parcial y el mosaicismo para trisomía 18 suelen presentar un fenotipo incompleto, con ausencia de algunas de las anomalías típicas del síndrome de Edwards, aunque en algunos casos el fenotipo completo típico de trisomía 18 puede darse asociado a mosaicismo.

La trisomía completa del cromosoma 18 (95% de los casos) es la segunda trisomía más frecuente después de la trisomía 21 y la prevalencia varía de 1/3600 a 1/10,000 con la estimación global de 1 en 6,000 recién nacidos vivos (Rasmussen *et al.*, 2003).

Este cromosoma extra completo se origina por medio de un error en la segregación de los cromosomas en la meiosis o por errores post-cigóticos en la mitosis y al igual que las trisomías comentada anteriormente, la frecuencia de no disyunción aumenta con la edad materna avanzada. En la trisomía 18 el cromosoma extra mayoritariamente tiene origen materno y el 50% de los errores de no disyunción en la ovogénesis ocurre en meiosis II, al contrario de las otras trisomías donde la segregación errónea se produce en la meiosis I. En cambio, en los pocos casos en los que la no disyunción es de origen paterna, el cromosoma extra se origina por errores en la segregación cromatídica durante la mitosis post-cigótica (Bugge *et al.*, 1998).

La mortalidad de los individuos con trisomía 18 completa es del 60% en la primera semana de vida y alcanza el 94-95% entre el primer y segundo año de vida, si superan este periodo la tasa de mortalidad es del 2% a los 5 años de vida (Rasmussen *et al.*, 2003). El riesgo de recurrencia para una pareja con feto anterior con trisomía 18 en torno al 1% (Carey, 2005).

La mayoría de los casos con trisomía 18 completa son diagnosticados prenatalmente, mediante el cribado de marcadores séricos maternos, en gestantes de edad materna avanzada, y cuando se detectan anomalías ecográficas en el segundo y tercer trimestre de gestación (Yamanaka *et al.*, 2006). Los marcadores ecográficos más frecuentes de la trisomía 18 detectados, a finales del periodo del primer trimestre o comienzos del segundo trimestre, son la translucencia nucal elevada y ausencia o hipoplasia del hueso nasal. Incluyendo la evaluación del ductus venoso o la regurgitación de la válvula tricuspídea, la tasa de detección aumenta al 83.3%.

Además, otras anomalías estructurales también son comúnmente detectadas durante la ecografía del primer trimestre de gestación, tales como: onfalocele, anomalía de la posición de las manos o megacititis y retraso en el crecimiento intrauterino, siendo más evidente en la ecografía del segundo trimestre. El cribado combinado del primer trimestre (translucencia nuchal, PAPP-A, b-hCG) y el cribado cuádruple del segundo trimestre (alfa fetoproteína, hCG total, estriol no conjugado e inhibin A) tiene una tasa de detección del 78% (Cereda & Carey, 2012).

En la evaluación de las fotografías tomadas a ambos fetos, se pudo observar diferencias fenotípicas, siendo los rasgos en el feto masculino de mayor severidad que en el feto femenino (*figura 4.7.*). El sesgo asociado al género, se ha ido observando a lo largo de la experiencia en el laboratorio. En el estudio llevado a cabo por Crider y colaboradores en el periodo 1994-2003 (Crider *et al.*, 2008) se observó una mayor prevalencia de recién nacidos vivos con trisomía 18 en fetos femeninos frente a los masculinos (F:M 60.4%). Aunque esta discordancia desaparece cuando este ratio se calcula de entre las interrupciones voluntarias del embarazo que presentan trisomía 18, existe una aparente mayor supervivencia en los fetos nacidos vivos femeninos es mayor que en los masculinos (Rasmussen *et al.*, 2003). Por ello, este fenómeno podría sugerir que pudiera existir interacción entre algún gen exclusivo del cromosoma sexual Y y algunos de los genes del cromosoma 18, durante la expresión génica en las factorías de transcripción, que agravara la severidad de las características fenotípicas durante el desarrollo. Sin embargo, serían necesarios estudios más exhaustivos para confirmar esta hipótesis.

4.1.2.1.2.3 Trisomía 13 (Síndrome de Patau)

La muestra fetal **AB-1373**, que correspondía a un feto de 24 semanas de gestación, fue referido con la indicación de estudio de síndrome de delección 22q11 (Síndrome de Digeorge) y presentaba hendidura paladar y genitales ambiguos (*figura 4.9*). El estudio molecular mediante QF-PCR reveló un patrón masculino y trisómico para los marcadores D13S631 y D13S634.



Figura 4.9. Fotografías del caso AB-1373.

La expresión fenotípica de la trisomía 13 es característica y consiste en anomalías faciales, esqueléticas y del sistema nervioso central, siendo también frecuentes las malformaciones estructurales del aparato cardiovascular, genitourinario y gastrointestinal (Phatak, 2004). *(La trisomía 13 constituye entre el 50-70% de las anomalías cromosómicas asociadas a hendiduras faciales (Chen, 2009). Los defectos faciales de la línea media tales como paladar hendido o fisura labial ocurre en 1 de cada 700 nacidos vivos y están relacionados tanto a factores ambientales como factores genéticos).*

La mayoría de los defectos estructurales asociados a trisomía 13 pueden ser identificados ecográficamente, al igual que en la trisomía 18 (Geipel *et al.*, 2010). Sin embargo, la incidencia varía dependiendo de la edad materna y el momento en el que se realiza el diagnóstico (Snijders *et al.*, 1995). A diferencia de la trisomía 18 y 21, el 85% de los fetos con trisomía 13 presentan taquicardia con un centil superior a 95. No obstante, la presencia de la tríada de holoprosencefalia, fisuras faciales y polidactilia es muy característica de esta trisomía. Sin embargo, es necesaria su confirmación mediante métodos citogenéticos o moleculares.

La trisomía 13 descrita por primera vez en 1960 (Smith *et al.*, 1960) representa la tercera aneuploidía autosómica viable más frecuente tras la trisomía 21 y trisomía 18 (Jones, 2006) cuya frecuencia se ha estimado en 1 de cada 5000 nacidos vivos (Tunca *et al.*, 2001).

La principal causa de fallecimiento en estos pacientes son las complicaciones cardiopulmonares. Alrededor del 50% fallecen durante el primer mes de vida y a los 6 meses han fallecido el 70% de los nacidos vivos y de los que sobreviven este periodo, el 80% de los nacidos con dicha anomalía no alcanza el aniversario de vida (Duarte *et al.*, 2004). Se ha llegado a sugerir que aquellos individuos con este síndrome que tienen mayor supervivencia puede ser debido a la ausencia de anomalías cardíacas u holoprosencefalia y que además, al igual que sucede en el caso de la trisomía 18, parece existir un ratio general de supervivencia superior en el caso de los fetos femeninos que en los masculinos (Iliopoulos *et al.*, 2005). El riesgo de recurrencia para una pareja con feto anterior con trisomía 13 es en torno al 1% (Carey, 2005).

4.1.2.1.2.4 Trisomía 15.

La muestra **AB-1362** procedente de un feto con sospecha clínica de anemia de Fanconi, que se trata de una enfermedad hereditaria autosómica recesiva con una frecuencia de 1 por cada 350.000 nacimientos y cursa con aplasia medular progresiva, predisposición tumoral y anomalías congénitas esqueléticas, cardíacas, renales así como malformaciones del sistema nervioso central con retraso mental y pigmentación anormal de la piel (Tischkowitz & Hodgson, 2003). Al menos 15 genes se han asociado a esta patología: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *BRIPI*, *FANCL*, *FANCM*, *PALB2*, *RAD51C* y *SLX4* (Dolan, et al., 2002).

En este caso, se identificó mediante QF-PCRC y QF-PCRD una triple dosis para los marcadores D15S123 y D15S1050 (*figura 4.10.*). Ambos microsatélites se encuentran localizados en el brazo largo del cromosoma 15 por lo que solo con este dato no es posible discriminar entre trisomía completa o trisomía parcial del brazo largo del cromosoma 15.

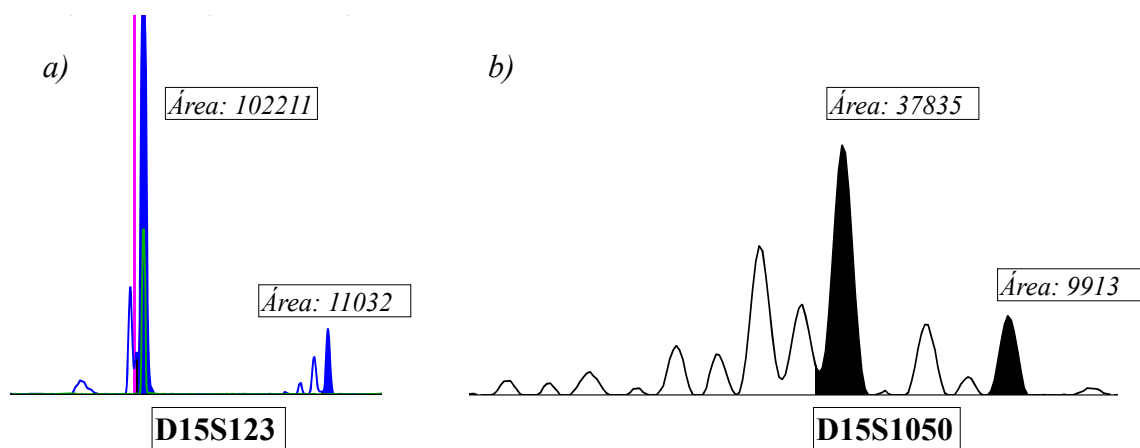


Figura 4.10. Amplicones de los marcadores cromosómicos a) D15S123 y b) D15S1050, empleados en la QF-PCR y QF-PCRD, donde se observó un patrón trisómico para estos microsatélites.

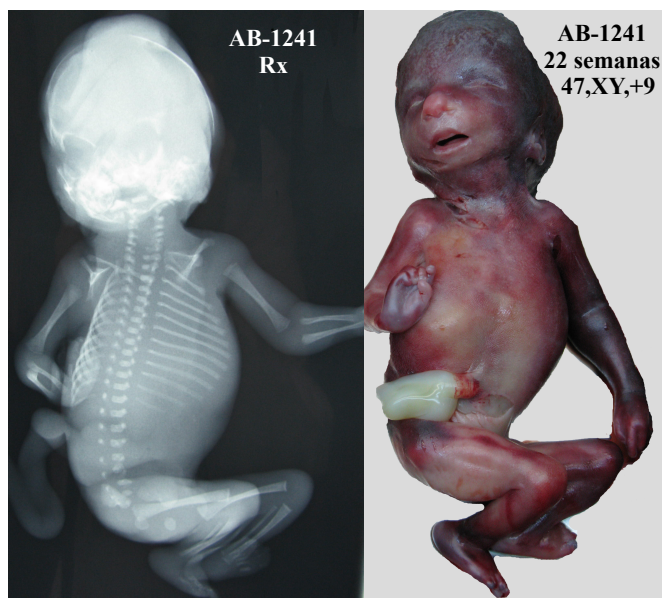
La trisomía 15 ocurre en el 1.4 % de los abortos espontáneos (Hassold, 1980), originada mayoritariamente por no disyunción meiótica materna (Zaragoza *et al.*, 1994), que ocurre con mayor frecuencia durante la meiosis I (Robinson *et al.*, 1996). La no disyunción materna para el cromosoma 15 está asociada con la elevada edad materna (Robinson *et al.*, 1993), y la gestante de este caso tenía 39 años de edad en el momento de la interrupción de la gestación.

En la literatura, se han descrito dos casos con trisomía completa del cromosoma 15 que presentaron anomalías congénitas. Coldwell y colaboradores en 1981, describieron un feto a término femenino con retraso en el crecimiento severo y múltiples anomalías congénitas (Coldwell *et al.*, 1981): craneofaciales (micrognatia, cuello ancho, baja implantación del pelo, fisuras palpebrales, pliegue del epicanto, fontanelas amplias), cardíacas y esqueléticas (hipoplasia de la clavícula derecha, anomalía bilateral de los acetábulos, fusión de los arcos vertebrales cervicales). Diez años más tarde, Kuller and Laifer reportaron un feto de 33 semanas de gestación tras ruptura espontánea de membranas cuyos datos ecográficos revelaron efusión pleural, polihidramnios, ascitis, e hidrops fetal (Kuller & Laifer, 1991).

Al igual que en los estudios mencionados anteriormente, en este estudio solo se analizó un solo tejido fetal, por lo que es posible que un análisis en otros tejidos hubiese podido revelar el estado mosaico de la trisomía, teniendo en cuenta el carácter letal de la trisomía 15 completa y dado que no hay otros casos descritos de nacidos vivos con trisomía del cromosoma 15.

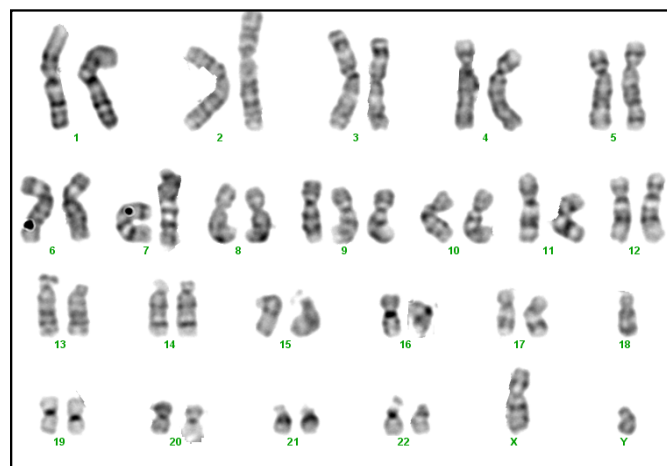
4.1.2.1.2.5 Trisomía 9

En las muestras AB-1241 y AB-1505 se identificaron mediante cariotipo, sendas trisomías del cromosoma 9 (AB-1241: 47,XY,+9; AB-1505: 47,XX,+9) (*figura 4.11. y 4.12*).



-La muestra **AB-1241** correspondía a un feto polimalformado, interrumpido voluntariamente a las 22 semanas de gestación. Los únicos datos clínicos de partida fueron que presentaba múltiples anomalías congénitas no detalladas. Gracias a la fotografía se pudo observar micrognatia y alteración de miembros, entre otros (*figura 4.11.*).

Figura 4.11. Fotografía y radiografía del caso AB-1241.



-El **AB-1505** fue referido con la sospecha clínica de malformación Arnold-Chiari. *(La malformación Chiari constituye una alteración en la base craneal, en la que se produce herniación del cerebelo y del tronco del encéfalo, a través del foramen magnum hasta el canal cervical).*

Figura 4.12. Cariotipo 47, XY+9 del caso AB-1241.

Pocos casos se han descrito con trisomía 9 completa, que hayan sido detectados ecográficamente en el periodo prenatal. La trisomía 9, especialmente la trisomía completa, es una cromosopatía rara que tiene un pronóstico letal, donde la mayoría de los fetos mueren en el periodo prenatal o durante etapas tempranas del periodo postnatal, por lo que la mayoría de los casos conlleva un aborto espontáneo de primer trimestre de gestación (Yeo *et al.*, 2003).

Solo ocho casos se han reportado con marcadores ecográficos alterados en el periodo prenatal (Nakagawa *et al.*, 2006). Dado que la mayoría de los casos acaban en aborto espontáneo de primer trimestre, rara vez llegan a término y aquellos fetos con trisomía 9 que llegan a sobrevivir al nacimiento, la trisomía se encuentra en mosaico (Sandoval *et al.*, 1999). Los síntomas asociados y los hallazgos clínicos en fetos con mosaicismo para la trisomía 9 varían en severidad, dependiendo del porcentaje de células con el cromosoma extra. Katayama y colaboradores en 1980 reportaron un infante con trisomía 9, que presentaba displasia de orejas con implantación baja, micrognatia, anomalías craneales, defectos cardíacos, anomalías de miembros, criptorquidia y micropenis (Katayama *et al.*, 1980).

Aunque tras el cariotipo observaron tres cromosomas 9, no se puede descartar que presente mosaicismo, ya que para descartarlo, sería necesario realizar cariotipo a partir de distintos tejidos de las tres capas embrionarias. Dado que el feto correspondiente a la muestra AB-1241 fue interrumpido voluntariamente a las 22 semanas de gestación, y debido al carácter letal de la trisomía completa del cromosoma 9, sobre todo en el primer trimestre de gestación, y observando las características clínicas que coinciden con algunas de los casos reportados en la literatura, con mosaicismo para la trisomía 9, sugieren que este caso pudiera ser mosaico, pero sería necesario estudios adicionales para confirmarlo. Asimismo, tampoco se podría descartar el estado de mosaicismo para dicha trisomía en el caso de la muestra fetal AB-1505.

4.1.2.1.3 MONOSOMÍAS:

4.1.2.1.3.1 Monosomía del cromosoma X (Síndrome de Turner)

La muestra **AB-1281** procedente de un feto de 13 semanas de gestación con sospecha de displasia ósea y la muestra **AB-1283** de un feto de 20 semanas de gestación que presentaba alteración del flujo de las arteria uterinas y crecimiento intrauterino retardado, fueron analizados mediante QF-PCR (*figura 4.13., 4.14 y 4.15*). Los resultados mostraron un patrón monosómico para el cromosoma X, que fue confirmado con el empleo adicional de tres marcadores localizados a lo largo del cromosoma X: DXS1073, DXS8055 y DXS991 (*figura 4.15*). Por lo cual, el diagnóstico final para ambos casos fue síndrome de Turner.

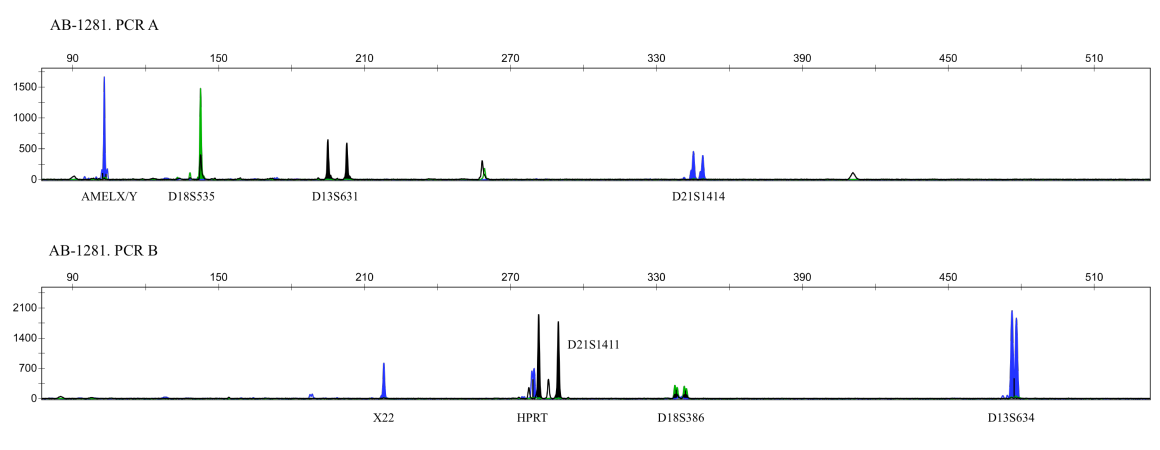


Figura 4.13. QF-PCRA y QF-PCRB del caso AB-1281.

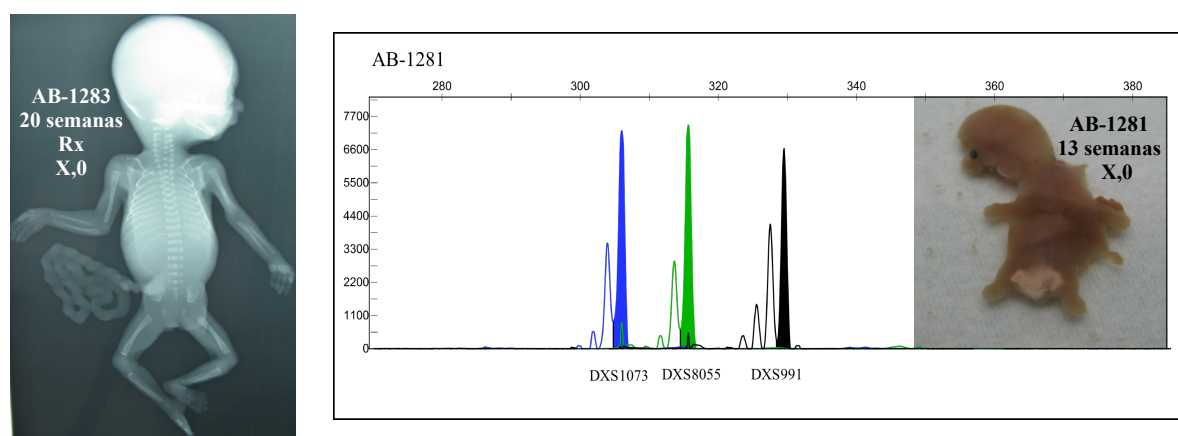


Figura 4.14. Radiografía del caso AB-1283.

Figura 4.15. Patrón monosómico de los marcadores DXS1073, DXS8055 y DXS991 (imagen izq.) del caso AB-1281 (imagen dcha.).

La monosomía del cromosoma X, es la anomalía cromosómica de los cromosomas sexuales más frecuente en mujeres, afectando a uno de cada 2000 fetos femeninos recién nacidos vivos (Robinson, 1990). Alrededor del 15% de los abortos espontáneos presentan un cariotipo 45,X (Lippe, 1991) y sólo un 1% de los embriones con cariotipo 45,X llegan a término (Cockwell *et al.*, 1991). La monosomía completa del cromosoma X es un hecho esporádico, cuya incidencia no está correlacionada con el incremento de la edad materna. De hecho, el cromosoma ausente suele ser de origen paterno en el 78% de los recién nacidos vivos con la dotación cromosómica 45,X (Lorda-Sanchez *et al.*, 1992). La pérdida del cromosoma sexual completo se debe a errores de no disyunción en la meiosis I paterna durante la gametogénesis (Jacobs *et al.*, 1997).

Esta cromosomopatía está asociada al síndrome de Turner, descrito por primera vez en 1938 (Turner, 1938) y se caracteriza por baja estatura, pliegue nuchal, implantación baja del cabello, implantación baja de las orejas, anomalías en las estructuras del lado izquierdo cardíaco, *cubitus valgus*, deformidad de Madelung, hipoplasia de uñas, paladar ojival, linfoedema de manos y pies y fallo ovárico, entre otros (Ranke & Saenger, 2001).

Este síndrome se identifica prenatalmente mediante evaluación ecográfica fetal, en la que presenta elevada translucencia nuchal, higroma quístico, polihidramnios, oligohidramnios, retraso en el crecimiento intrauterino, coartación aórtica u otros defectos de las estructuras del lado izquierdo cardíaco, braquicefalia, y anomalías renales. Los marcadores séricos muestran altos niveles de la hCG e inhibina A y niveles ligeramente disminuidos de la Alfafetoproteína y estríol no conjugado (Ruiz *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2000; Wenstrom *et al.*, 1998). Sin embargo, ante sospecha ecográfica de dicha anomalía cromosómica es necesaria la confirmación mediante métodos citogenéticos o moleculares.

En el 50% de los casos diagnosticados con síndrome de Turner, presentan cariotipo 45,X, mientras que en los casos restantes se debe a mosaicismos (45,X/46XX; 45,X/46,XY) o reordenamientos cromosómicos, isocromosomas del brazo largo del cromosoma X (46,X,i(Xq)), deleciones (46,X,del(X)), anillos (46,X,r(X)) o translocaciones (Hall & Gilchrist, 1990).

La haploinsuficiencia de múltiples genes en el cromosoma X o la pérdida del cromosoma Y afecta al desarrollo del crecimiento fetal y la función gonadal. La estatura baja está relacionada con la falta de un alelo del gen *SHOX* que consiste en un factor de transcripción localizado en la región cromosómica Xp22 y se expresa en las células osteogénicas (Binder, 2011). Las deleciones parciales del cromosoma X pueden afectar a la función ovárica: las deleciones que afectan la región Xp11, suelen conllevar una disfunción ovárica en el 50% de los casos, mientras que deleciones parciales en regiones más distales como la Xp21, suelen generar un fenotipo más leve (Layman, 2002).

4.1.2.1.3.2 Monosomía del cromosoma 21

La muestra **AB-1256** procedía de un feto de 7 semanas de gestación. Dado que el cultivo falló por el estado macerado del feto se procedió a la toma de muestra tanto de vellosidad corial fetal como decidua para estudios moleculares. Se siguieron las guías de buenas prácticas de EMQN (European Molecular Quality Network, St Mary's Hospital, Manchester, United Kingdom), realizando la técnica QF-PCR, para descartar la contaminación materna y determinar el origen fetal de la muestra, que a su vez permite analizar las aneuploidías más frecuentes en los fetos con malformaciones congénitas. Mediante esta tecnología se pudo confirmar el origen fetal de la vellosidad corial, así como la determinación del sexo masculino del feto. El análisis de los marcadores empleados en esta técnica se observó que la muestra fetal presentaba la pérdida alélica materna para los marcadores D21S1411 y D21S1411 (*figura 4.16.*).

Para determinar si se trataba de un fallo de amplificación o de una pérdida parcial o total del cromosoma 21 o de alguna estructura más compleja y dada la ausencia del cariotipo, se procedió al empleo de MLPAp036 y p070, que contiene sondas subteloméricas para los brazos cortos y largos de todos los cromosomas (*figura 4.17.*).

En este caso se observó una disminución del 50% de todas las sondas correspondiente al cromosoma 21 (*figura 4.17.*). Dado que las sondas empleadas hibridaban en la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma 21 y en la región subcentromérica del mismo, se podría tratar de una monosomía 21 total, o de un desequilibrio cromosómico más complejo. Paralelamente, se realizó un estudio de microsatélites localizados a lo largo del cromosoma 21, mediante el empleo de dos microsatélites más D21S263 y D21S266, en los que se observó también una pérdida del alelo materno (*figura 4.18.*). Posteriormente, se realizó el estudio de la muestra mediante microarray de CGH de 1Mb de resolución, que determinó la monosomía 21 completa para esta muestra fetal (*figura 4.19.*).

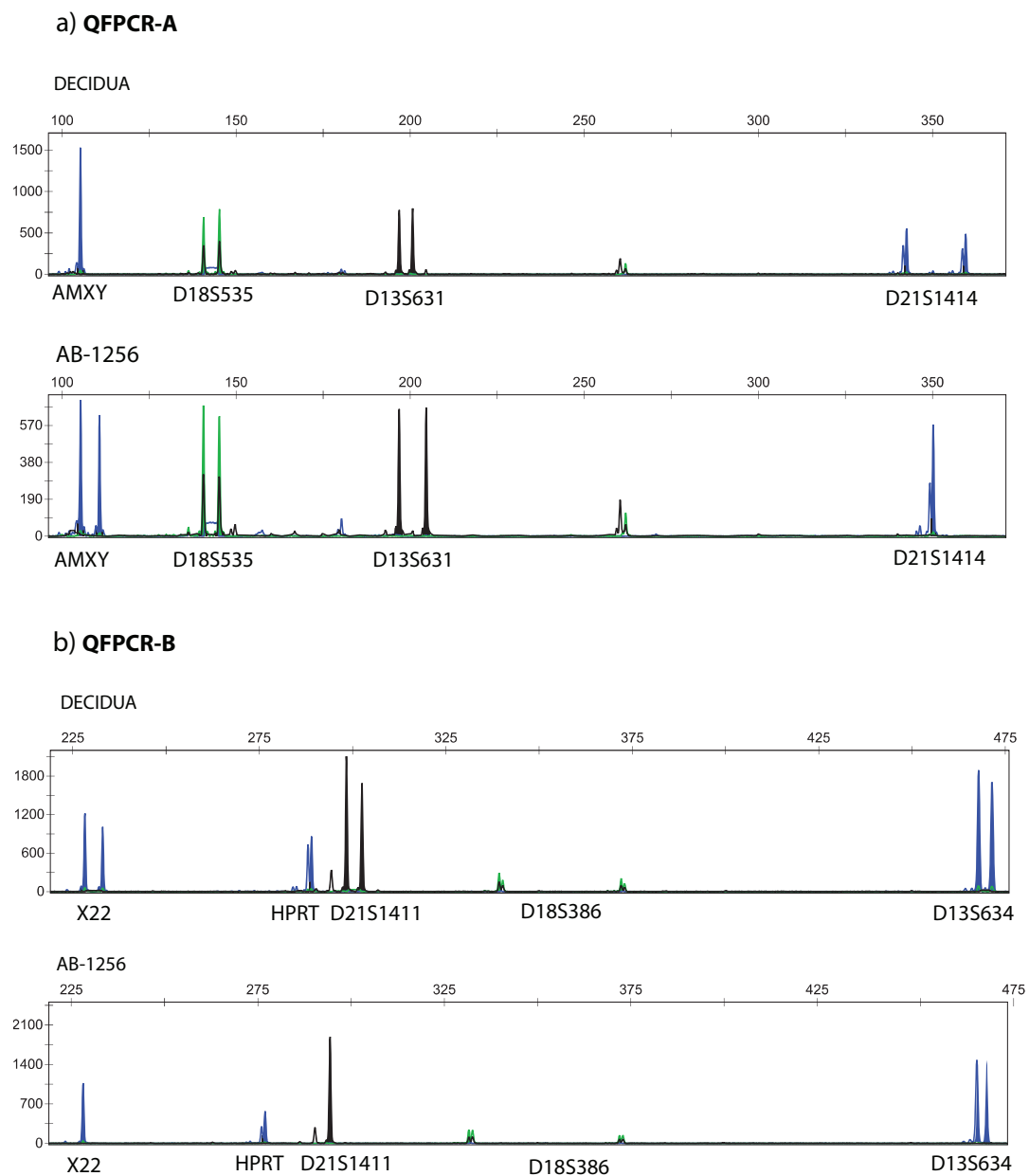
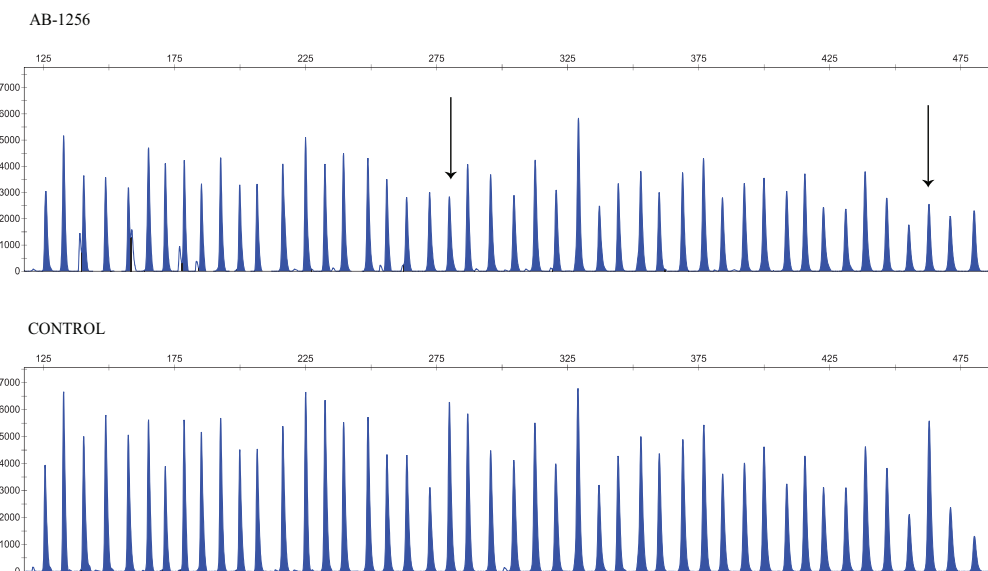


Figura 4.16. QF-PCRA y QF-PCRB, de la muestra AB-1256 comparada con la decidua, en la que se observa la pérdida del alelo materno para los marcadores D21S1414 y D12S1411. Los marcadores de los cromosomas sexuales mostraron un patrón masculino para la muestra AB-1256.

a) MLPA P036



b) MLPA P070

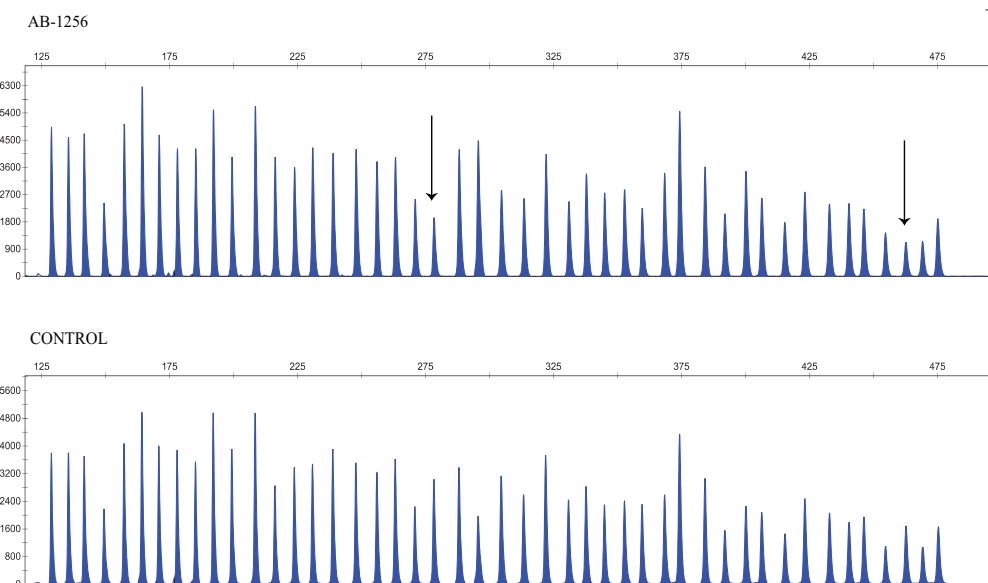


Figura 4.17. Resultado de los kits p036 y p070 de MLPA para la muestra AB-1256 comparada con una muestra control donde se observa que para los amplicones correspondientes a las señales correspondientes a las sondas que hibridan en el cromosoma 21, se encuentran delecionadas en comparación con la muestra control.

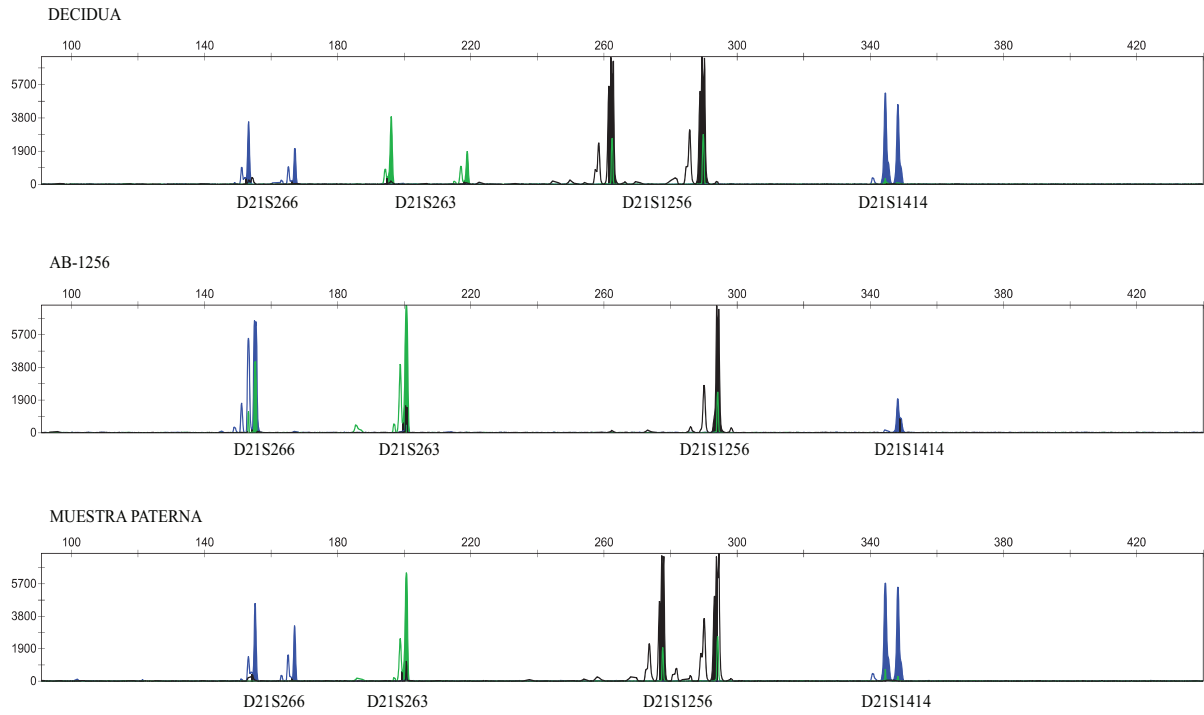


Figura 4.18. Análisis en multiplex de los microsatélites D21S266, D21S263, D12S11 y D12S1414.

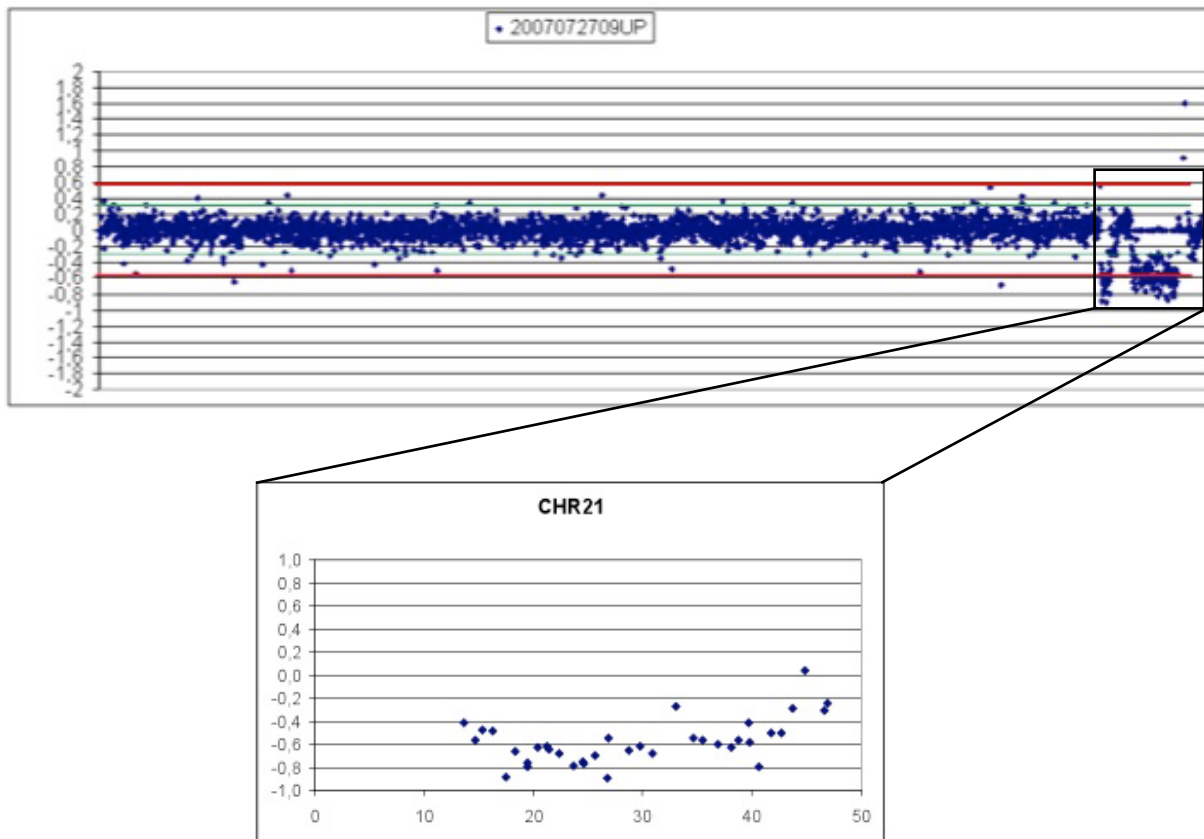


Figura 4.19. Array CGH de 1Mb de resolución ampliando la imagen a la delección completa del cromosoma 21.

Pocas monosomías se han descrito en total en la literatura y la mayoría de ellas fueron descritas previa a la era molecular, por lo que cuando fueron revaluadas por las técnicas moleculares, se diagnosticaron finalmente como monosomías parciales. El AB-1256, representa el primer caso de monosomía completa del cromosoma 21 detectado por MLPA, y el segundo caso reportado en España (Martínez-García *et al.*, 2011) ya que el primero fue publicado en 2004 (Mori *et al.*, 2004). La pérdida de un cromosoma completo suele ser letal, de hecho solo, la monosomía del cromosoma sexual X, es compatible con la vida. Esta letalidad podría explicarse por la haploinsuficiencia de genes del desarrollo como por ejemplo los genes *DYRK1A* y *SIM2* que se han propuesto como genes particularmente importantes, con funciones críticas en el desarrollo del sistema nervioso central en modelos animales y se ha descrito en un pacientes con microcefalia severa en el que se identificó una microdelección de 3.97 Mb en la región cromosómica 21q22 y donde se localizan dichos genes (Fujita *et al.*, 2010).

4.1.2.2 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES

4.1.2.2.1 Anillo del cromosoma 10

La muestra **AB-1160** correspondía a un feto con hirocele e higroma quístico de 8 milímetros. Mediante cariotipo se observó un cromosoma en anillo correspondiente al cromosoma 10. Paralelamente, se realizó el estudio de la muestra mediante los kits de MLPA p036 y p070 y se detectó una disminución del 50% de los amplicones correspondientes a las sondas, que hibridan en las regiones subteloméricas del cromosoma 10.

Los cromosomas en anillo se suelen formar a partir de dos roturas terminales en ambos brazos del cromosoma, seguido de la fusión de los extremos, lo que conlleva a una pérdida de material genético. Alternativamente, se pueden formar por la fusión de secuencias subteloméricas o fusión telómero-telómero sin delección. Sin embargo, también se han observado otras formas más complejas de formación de cromosoma en anillo (Guilherme *et al.*, 2011).

En la literatura, se han reportado numerosos casos con clínica común: baja estatura, discapacidad intelectual, microcefalia, dismorfismo facial, anomalías oculares y del trato urinario (hidronefrosis) e infecciones urinarias recurrentes. De hecho, lo han denominado como síndrome del cromosoma 10 en anillo. Sin embargo, pocos estudios se han realizado acotando los puntos de ruptura y en un estudio reciente concluyen que no hay hallazgos clínicos específicos como para definir el síndrome r(10) (Guilherme *et al.*, 2012).

En este estudio, al no haber empleado técnicas adicionales, no se pudo determinar el punto de ruptura. Además, no se puede esclarecer si el feto hubiera desarrollado los mismos signos clínicos u otros adicionales, ya que los fenotipos asociados a anillos cromosómicos, en general son altamente variables, debido a la inestabilidad de éstos. Se ha observado que además de la pérdida inicial de material genético que se produce en su formación, pueden ocurrir ganancias o pérdidas posteriores, conllevando a otros desequilibrios cromosómicos, provocando la consecuente manifestación fenotípica (Guilherme *et al.*, 2011).

4.1.3. CRIBADO DE DELECIONES O DUPLICACIONES CRÍPTICAS MEDIANTE ARRAYS

A partir del descubrimiento de la existencia de variaciones en el número de copia de regiones genómicas (CNV), de la incorporación de las nuevas herramientas moleculares con cobertura genómica de alta resolución y de la asociación de dichas variaciones a manifestaciones fenotípicas, surgieron numerosos estudios científicos con el objetivo de avanzar en el entendimiento de los diferentes agentes patogénicos.

Una gran cantidad de estudios fueron dirigidos hacia la determinación de la asociación entre CNVs y los defectos congénitos, en aquellos casos donde existe un alto porcentaje de etiología desconocida, letalidad y/o cierto grado de incapacidad como: cardiopatías congénitas, retraso mental, malformaciones congénitas múltiples, enfermedades de carácter complejo etc (Poot *et al.*, 2011).

En la determinación de las bases biológicas de las anomalías de miembros, los estudios se han centrado mayoritariamente en la búsqueda de mutaciones puntuales, en aquellos genes ortólogos a los genes de modelos experimentales de ratón, cuyas mutaciones producen un fenotipo similar al humano. Sin embargo, esta relación no ha sido siempre directa por lo tanto, (Wilkie, 2002), a pesar de los diferentes estudios genéticos, aún queda precisar la funcionalidad precisa de algunos de ellos.

En esta línea, se seleccionaron en este estudio diferentes restos abortivos que incluían anomalías de miembros de diferente índole (aislados o asociados a otros defectos), para estudio mediante arrays CGH, a fin de identificar nuevos genes o nuevos *loci* candidatos que pudieran explicar el fenotipo en dichos casos y así, ahondar en el estudio de este defecto. Se seleccionaron 6 casos en total, con diferentes anomalías en las extremidades para la búsqueda de CNVs (*figura 4.20-4.25*): AB-1054, AB-1123, AB-1379, AB-1438, AB-1509 y AB-1529. En 4 de los casos (AB-1054, AB-1379, AB-1509 y AB-1529). se identificaron CNVs no descritas previamente:

- En el caso **AB-1054**, se identificaron 6 regiones genómicas, de las cuales 5 no han sido relacionadas aún, con manifestaciones fenotípicas, en la literatura (*figura 4.20.*). En esta muestra se detectó además, una duplicación en el cromosoma 5, donde se localiza el gen *VDAC*. Esta misma duplicación ha sido descrita en un paciente con dismorfia y retraso psicomotor, en la base de datos Decipher. No obstante, para determinar la posible patogenicidad de esta región serían necesarios más estudios.
- En el caso **AB-1379**, de todas las regiones en las que se detectaron CNVs, no se conoce implicación patológica en ninguna de ellas (*figura 4.22.*).
- En el caso **AB-1509**, de las dos regiones duplicadas, una involucra al gen *IFBN* donde se conoce que interviene en la diferenciación de osteoclastos (Miyamoto & Suda, 2003) (*figura 4.24.*). En ratones con deficiencia de este gen, se ha observado además una osteopenia marcada (Sato & Takayanagi, 2006).

- En el caso **AB-1529**, que presentaba amelia bilateral superior, tras el análisis de la muestra mediante array CGH, se observaron duplicaciones en dos regiones genómicas (*figura 4.25.*). Aunque hay varios casos de amelia descritos en la literatura, la mayoría de ellos, corresponden a casos donde se ven afectados las cuatro extremidades y de hecho, se ha descrito el gen cuyas mutaciones generan tetramelia: WNT7A (Eyaid *et al.*, 2011). En los pocos casos descritos con amelia bilateral superior, se ha relacionado el fenotipo con exposición a teratógenos (Singhal *et al.*, 2011), sin embargo, no se ha determinado aún si existe alguna causa genética que pudiera ocasionar tal manifestación clínica. Dado la manifestación del carácter, se analizó la secuencia codificante del gen *TBX5*, por ser un factor de transcripción que interviene en la formación de los miembros superiores. La región codificante de este gen fue evaluada mediante secuenciación y MLPA p179 y p180, sin embargo, no se encontraron mutaciones ni deleciones o duplicaciones, en este gen. No obstante, no se descartan mutaciones en regiones reguladoras o en otros genes que participen en el límite entre la inducción de la formación embrionaria del primordio de la extremidad superior y el inicio del mantenimiento de la misma.

A pesar de los hallazgos encontrados en estos restos abortivos, sería necesario el análisis adicional de las muestras genéticas de los progenitores, para descartar si dichos resultados forman parte de la variabilidad genotípica humana, o por lo contrario, para poder determinar finalmente la implicación patológica de dichas CNVs. La falta de accesibilidad de dichas muestras, imposibilitó el establecimiento de dichas causas como la causa final de la manifestación fenotípica. Teniendo en cuenta las implicaciones psicológicas relacionadas con un aborto, ya sea espontáneo o terapéutico, sería recomendable obtener las muestras de los progenitores en el momento de la intervención gestacional, ya que posteriormente resulta más complejo.

- En los 2 casos restantes (AB-1123 y AB-1438) se detectaron CNVs previamente descritas en individuos de población general y por lo tanto, o bien existe alguna pérdida cromosómica de menor resolución que esta tecnología no ha sido capaz de detectar, o bien, las manifestaciones fenotípicas en estos casos se deben a mutaciones en genes relacionados con la formación de los miembros.

- En el caso **AB-1123**, se detectaron 31 CNVs descritas en población control (*figura 4.21*). El hecho de que en una gestación anterior de la pareja se detectaran alteraciones fenotípicas similares a este feto, sugiere que pueda estar alterado un gen relacionado con alguna patología de herencia recesiva, o más bien, que exista mosaicismo germinal en alguno de los progenitores que explique la recurrencia de la anomalía y que no haya sido detectada mediante la tecnología aplicada. En este caso se recomendaría el empleo de SNPs array para la detección de pérdida de heterocigosidad a fin de valorar genes implicados, o el empleo de secuenciación masiva para la búsqueda de variantes patológicas en genes candidatos.

- En el caso **AB-1438**, se detectaron 22 CNVs descritas en población control (*figura 4.23*). Sin embargo, es posible que la sindactilia observada en los extremidades, así como la presencia de artrogriposis e hidrops fetal, estén relacionadas con alguna mutación en genes implicados en el desarrollo esquelético y/o cardiovascular. Aunque, se descartaron mutaciones, deleciones o duplicaciones, en la región codificante el gen *TBX5*, este caso sería un buen candidato para estudio de exoma completo a fin de determinar alguna mutación en genes relacionados con la anomalía de miembros y otras alteraciones observadas en este caso.

No obstante, dado que no se analizaron estas muestras mediante plataformas de secuenciación masiva, no se puede determinar que sean dichas CNVs sean responsables de la manifestación fenotípica en su totalidad. La diferente combinación de CNVs con mutaciones en otras regiones pueden aportar variabilidad fenotípica, por lo que serían necesarios otros estudios.

CASOS	DATOS CLÍNICOS	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA IDENTIFICADA POR ARRAY	GENES INCLUIDOS Y SU FUNCIÓN PROTEICA	CASOS DESCRITOS
AB-1054	Feto con malformación de miembros	arr 5q31.1 (133,333,121-133,356,872)x3	Gen: <i>VDAC1</i> Función: canal aniónico dependiente de voltaje que se encuentra en mitocondrias y que muestra un patrón de expresión amplio.	deficiencia completa de VDAC en el músculo esquelético de un paciente con: macrosmia, dismorfia, retraso psicomotor y polimicrogria.
		arr 8p12 (37,755,737-37,847,279)x3.	4 genes: 1- Gen: <i>PROSC</i> Función: cotranscripción con el gen de la prolina sintetasa 2- Gen: <i>GPR124</i> Función: receptores transmembrana acoplados a proteína G 3- Gen: <i>BRF2</i> Función: interacción con proteínas de unión a caja TATA para iniciar la nucleación de snRNAs específicos para RNA polimerasa-III, durante la formación del complejo de iniciación de la transcripción. 4- Gen: <i>RAB11FIP1</i> Función: interaccionan y regulan las Rab GTPasas, encargadas de la formación, direccionamiento y fusión de vesículas de transporte intracelular.	No se conoce hasta ahora implicación en patología
		arr 15q22.2 (60,860,218-60,878,254)x3	Gen: <i>TLN2</i> (afecta a 5 exones) Función: Talina es una proteína adaptadora que une moléculas de adhesión de la familia de las integrinas con la actina F del citoesqueleto. Juega un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de estructuras musculares esqueléticas.	No se conoce hasta ahora implicación en patología
		arr 18q12.2 (35,459,923-35,472,879)x1	Gen: (<i>LOC647946</i>) Función: desconocida	No se conoce hasta ahora implicación en patología
		arr 22q12.3 (34,028,597-34,043,306)x3. arr Xq21.33 (95,084,775-95,486,772)x1	Gen: <i>TOM1</i> (región intrónica) Función: desconocida Gen: (<i>LOC643486</i>) Función: desconocida	No se conoce hasta ahora implicación en patología No se conoce hasta ahora implicación en patología

Figura 4.20. Indicación clínica, resultados del array CGH, genes incluidos en las regiones con CNVs del caso AB-1054 e implicación patogénica descrita de dichas CNVs.

CASO	DATOS CLÍNICOS	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA IDENTIFICADA POR ARRAY
AB-1123	Feto polimalformado 	<p>Se han identificado 31 regiones que coinciden con CNVs, previamente identificadas en individuos de la población general.</p> <p>Se han descartado con una alta probabilidad la existencia de duplicaciones y/o deleciones que tengan un tamaño por encima de la resolución media del array (~50Kb) en las regiones interrogadas por las sondas que lo componen.</p> <p>Este resultado no descarta la existencia de reordenamientos equilibrados, mutaciones u otras alteraciones de número de copia de menor tamaño o en regiones del genoma no interrogadas por el array.</p>

Figura 4.21. Indicación clínica, fotografía y radiografía del caso AB-1123 y resultados del empleo de array CGH.


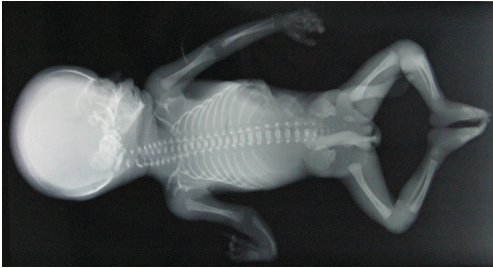
CASOS	DATOS CLÍNICOS	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA IDENTIFICADA POR ARRAY	GENES INCLUIDOS Y SU FUNCIÓN PROTEICA	CASOS DESCritos
AB-1379	Anemia de Fanconi. Feto con malformación de miembros.  	arr 12q24.12 (110,668,304-110,799,706)x3	4 genes: 1- Gen: <i>ACAD10</i> Función: enzimas responsables del catabolismo de ácidos grasos y aminoácidos. 2- Gen: <i>ALDH2</i> Función: forma de alcohol deshidrogenasa y la presencia de mutaciones se asociada a sensibilidad aguda al alcohol 3- Gen: <i>C12orf47</i> Función: desconocida. 4- Gen: <i>MAPKAPK5</i> Función: serin-treonin kinasas y participa en cadenas de transducción de señal. Esta proteína se activa en respuesta a estrés celular y a citoquinas proinflamatorias.	No se conoce hasta ahora implicación en patología

Figura 4.22. Indicación clínica, fotografía y radiografía del caso AB-1379, resultados del empleo de array CGH e implicación patológica de dichas CNV's



CASOS	DATOS CLÍNICOS	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA IDENTIFICADA POR ARRAY
AB-1438	<p>Feto con hidrops fetal, artrogriposis y ectrodactilia.</p> <div></div> <div></div>	<p>Se han identificado 22 regiones que coinciden con CNVs previamente identificadas en individuos de la población general.</p> <p>Se han descartado con una alta probabilidad la existencia de duplicaciones y/o deleciones que tengan un tamaño por encima de la resolución media del array (~50Kb) en las regiones interrogadas por las sondas que lo componen. Este resultado no descarta la existencia de reordenamientos equilibrados, mutaciones u otras alteraciones de número de copia de menor tamaño o en regiones del genoma no interrogadas por el array.</p>

Figura 4.23. Indicación clínica, fotografía, y ecografía del caso AB-1438, resultados del empleo de array CGH .

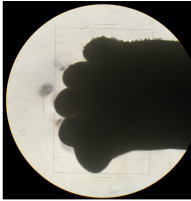
CASO	DATOS CLÍNICOS	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA IDENTIFICADA POR ARRAY	GENES INCLUIDOS Y SU FUNCIÓN PROTEICA	CASOS DESCRITOS
AB-1509	Embrión con TN de 4 mm, sindactilia del 1º y 2º dedo del pie derecho 	arr 9p21.3 (20,997,945-21,149,531)x3	3 genes: 1- Gen: <i>PTPLAD2</i> Función: tirosina fosfatasa “like” involucrada en distintos tipos de neoplasias 2- Gen: <i>IFNWI</i> Función: interferon omega 1 3- Gen: <i>IFNBI</i> Función: procesos tumorales y además tiene un papel en la homeostasis ósea, inhibiendo la diferenciación de osteoclastos	En ratones mutantes para la función de señalización de IFNB se observa una osteopenia severa acompañada de una osteoclastogénesis aumentada.
		arr Yq11.221 (14,681,538-14,712,696)x3	No afecta a ningún gen	Su contribución al fenotipo puede ser considerado como poco relevante.

Figura 4.24. Indicación clínica, fotografía del pie derecho del caso AB-1509, resultados tras el empleo de array CGH e implicaciones patológicas de las CNVs halladas.


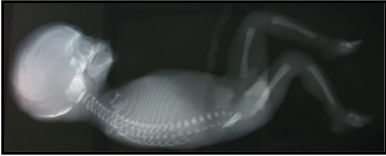
CASO	DATOS CLÍNICOS	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA IDENTIFICADA POR ARRAY	GENES INCLUIDOS Y SU FUNCIÓN PROTEICA	CASOS DESCRITOS
AB-1529	Feto con amelia superior bilateral  	arr 12q24.32 (127,443,412-127,459,239)x1	Gen TMEM132C Función: desconocida	No se conoce hasta ahora implicación en patología
		arr 20q11.21 (30,164,834-30,175,972)x1	Gen TM9SF4 Función: desconocida	Afectación de la inmunidad celular traducida en defectos morfológicos en las larvas de Drosophila

Figura 4.25. Indicación clínica, fotografía y radiografía del caso AB-1529, resultados tras el empleo de array CGH e implicaciones patológicas de las CNVs halladas.

4.1.4. CARACTERIZACION GENÉTICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN SANGER: MUTACIONES PUNTUALES

El hallazgo de la causa genética, mediante los estudios moleculares, es importante para confirmar una sospecha clínica, pero el algoritmo para llevar a cabo este análisis depende estrechamente de la evaluación clínica. En muchas ocasiones, la precisión de una determinada sospecha clínica está sujeta a limitaciones, como la expresión variable de un determinado defecto o bien el momento de su manifestación. Además, la evaluación ecográfica está limitada por la complejidad del defecto congénito, por la posición fetal, por la elevada edad gestacional o por la obesidad de la gestante. Sin embargo, en otras ocasiones, a pesar de existir un diagnóstico preciso, los detalles no son transferidos a los genetistas, lo que complica el estudio molecular.

Para poder realizar un adecuado cribado de los posibles genes que puedan estar involucrados en malformaciones congénitas, es necesario una cooperación entre los distintos especialistas, así como proporcionar al laboratorio una descripción detallada de la información clínica para poder llevar a cabo un análisis molecular dirigido. En los siguientes apartados se comentan estos aspectos de forma detallada, analizando los resultados de muestras fetales con cardiopatías, anomalías craneofaciales y/o esqueléticas.

4.1.4.1 CRIBADO GENÉTICO DE GENES RELACIONADOS CON CARDIOPATÍAS, Y/O ANOMALÍAS DE MIEMBROS

Las cardiopatías congénitas son uno de los principales defectos congénitos y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad mundiales (Bruneau, 2008). Además, se considera la primera causa de mortalidad en los primeros años de vida del recién nacidos (Hoffman & Kaplan, 2002).

Aunque la mayoría de recién nacidos con cardiopatías congénitas no presentan otros defectos congénitos, las cardiopatías congénitas se presentan en asociación con otras anomalías o como parte de un síndrome en el 25 al 40% de los casos (Richards & Garg, 2010).

Las malformaciones cardíacas afectan principalmente a las estructuras del lado izquierdo cardíaco, siendo las principales: la estenosis aórtica, válvula aórtica bicúspide, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico y coartación aórtica (Pierpont *et al.*, 2007).

A pesar de que se propuso que los defectos cardíacos tienen carácter multifactorial, los estudios de secuenciación del genoma humano y los avances en las técnicas moleculares han proporcionado cada vez más evidencias de una mayor contribución de los factores genéticos (Richards & Garg, 2010).

En general, el 30% de los recién nacidos con anomalías cromosómicas presentan cardiopatías congénitas (Pierpont *et al.*, 2007). Este porcentaje varía según la cromosomopatía, de tal manera que, el 50% de los individuos con trisomía 21, el 80% de los casos con trisomía 18 y 1/3 de las mujeres con síndrome de Turner presentan defectos cardíacos (Richards & Garg, 2010). En hombres con síndrome Klinefelter (47,XXY) hay un 50% de incidencia de cardiopatías con *ductus arteriosus* patente o defectos en el septo atrial (Pierpont *et al.*, 2007).

A lo largo de las últimas décadas se ha ido incrementando el conocimiento de las rutas moleculares en el desarrollo cardíaco y los estudios en modelos animales han ido identificando progresivamente numerosos reguladores transcripcionales, moléculas de señalización y genes estructurales cruciales para la morfogénesis cardíaca. Los avances derivados del proyecto genoma humano, permitieron además determinar numerosas mutaciones génicas en muestras humanas, responsables de defectos cardíacos asociados a síndromes.

Dada su relación con las cardiopatías congénitas, y viendo la posible correlación genotipo-fenotipo, se realizó un cribado de los genes *TBX5*, *TBX1* y *PTPN11* a aquellos fetos que presentaban cardiopatías:

- El **gen *TBX5***, al ser un factor de transcripción con un papel crucial en el desarrollo cardíaco y miembros, fue analizado en individuos que presentaron anomalías de miembros con o sin cardiopatía. En el caso AB-446, que fue diferido con una indicación de sospecha de síndrome de Holt-Oram, se descartaron mutaciones en la región codificante del gen mediante secuenciación Sanger y deleciones o duplicaciones mediante MLPA tanto en este gen como en otros genes relacionados con malformación de miembros, empleando los kits p179 y p180. Aunque no se han realizado estudios de las regiones reguladoras, a juzgar por los rayos y las fotografías, parece que el caso no encajaría en los criterios clínicos estrictos asociados al síndrome establecidos en 2005 (McDermott *et al.*, 2005). Tal y como se menciona en el apartado específico del síndrome de Holt-Oram, (*ver más detalle en pág. 219*) la tasa de detección mutacional del síndrome disminuye al 25%, cuando no se las manifestaciones fenotípicas no se ajustan a los criterios críticos estrictos.

- En cuanto al **gen *TBX1***, al ser también un factor transcripcional importante en el desarrollo cardíaco, se empleó para realizar un cribado en fetos con malformaciones cardíacas y determinar así, su implicación en las cardiopatías congénitas en los restos abortivos. Pero al igual que para el gen anterior, tampoco se detectaron mutaciones puntuales en la región codificante de éste. Al haberse descrito mutaciones puntuales en el gen *TBX1* que producían fenotipo similar al ocasionado por la microdeleción en la región cromosómica 22q11 (Zweier *et al.*, 2007) (*ver más detalle en pág. 193*), también se analizó este gen en los abortos AB-1081 y AB-1373 que tenían sospecha de síndrome de deleción 22q11 pero no presentaban la deleción. Sin embargo, tampoco se detectaron mutaciones puntuales.

-En lo que respecta al **gen *PTPN11***, responsable del 50% del síndrome de Noonan, tampoco se detectaron mutaciones en las muestras analizadas, las cuales presentaban indicación de cardiopatías. La elevada heterogenidad clínica del síndrome de Noonan dificulta su diagnóstico, particularmente en recién nacidos y en individuos adultos que presentan características faciales menos aparentes (Eccles *et al.*, 2003), tornándose más complejo su diagnóstico en el periodo prenatal. El diagnóstico clínico prenatal del síndrome de Noonan está indicado en fetos con translucencia nuchal elevada, acitis, efusión pleural, hidrops fetal, polihidramnios, cardiopatías, anomalías renales y ausencia de cromosomopatías (Schlüter *et al.*, 2005).

Sin embargo, todas las características anteriormente descritas no son específicas del síndrome de Noonan y pueden encontrarse en fetos sin ningún síndrome genético conocido. Por ello, el diagnóstico intraútero del síndrome de Noonan antes de la disponibilidad de las pruebas moleculares, supuso un reto (van der Burgt, 2007). Las anomalías en el desarrollo del sistema linfático en los pacientes con síndrome de Noonan aparecen como un aumento en la translucencia nuchal o higroma quístico; signos clínicos que se han propuesto como responsables de los rasgos faciales y el engrosamiento del cuello característicos del síndrome (Donnenfeld *et al.*, 1991). En 2009 se realizó un estudio retrospectivo, para determinar la utilidad del cribado del gen *PTPN11*, basándose en alteraciones ecográficas tales como: higroma quístico, translucencia nuchal e hidrops fetal (Lee *et al.*, 2009). Estos autores determinaron que el higroma quístico es más fiable que la translucencia nuchal, para el diagnóstico de síndrome de Noonan, ya que en un 16% de los fetos con higroma quístico presentaron mutaciones en el gen *PTPN11* frente al 2% de aquellos con translucencia nuchal elevada. En el presente estudio, las indicaciones generales en los que fueron referidos gran parte de los abortos como: cardiopatía, alteración cardíaca, etc, dificultaron una selección más precisa de los abortos en función de las alteraciones ecográficas.

No se encontraron mutaciones en ninguno de los genes estudiados en los fetos con defectos cardíacos. La falta de información clínica detallada de las manifestaciones fenotípicas de los defectos congénitos en los abortos y en concreto del tipo de cardiopatía, la falta de información de historia familiar sobre todo en las muestras procedentes de clínicas privadas, la poca definición de las características fenotípicas en individuos en formación, así como el carácter heterogéneo de los síndromes asociados a estos genes, imposibilitaron el establecimiento de un estudio molecular más dirigido para la búsqueda de mutaciones en aquellos genes responsables del defecto cardíaco en cuestión.

4.1.4.2 CRIBADO GENÉTICO DE GENES RELACIONADOS CON ANOMALÍAS CRANEOFACIALES

Las malformaciones craneofaciales corresponden a una de las patologías más prevalentes en la edad pediátrica. Algunas de ellas, como las craneales, pueden poner en peligro la vida del infante o dejar secuelas tan irreversibles como el déficit intelectual (Cohen, 2002).

La holoprosencefalia es la malformación craneofacial más frecuente asociada a múltiples anomalías congénitas, cuyo defecto principal es la alteración en el desarrollo del prosencefalo, debido a un fallo en la división de los dos hemisferios cerebrales. La etiología de este anomalía es heterogénea y puede manifestarse de forma aislada o asociada a anomalías en otros sistemas. Este defecto puede ser ocasionado por diferentes factores medioambientales: factores metabólicos (como diabetes materna, que aumenta al 1% el riesgo de tener un feto con holoprosencefalia); hipocolesterolemia materna; alcoholismo sumado al tabaquismo; exposición a drogas o infecciones (Ming & Muenke, 2002); o por diferentes factores genéticos: entre el 25-50% de los casos sindrómicos presentan anomalías cromosómicas (trisomía 13, trisomía 18 y poliploidía); entre el 18-25% con herencia monogénica presenta un síndrome reconocible y entre el 5-10% de los casos presentan holoprosencefalia de forma aislada, con mutaciones en uno de los 12 *loci* asociados de herencia autosómica dominante. En general, las mutaciones reportadas con mayor frecuencia afectan a los genes *SHH* (12% de los casos), *ZIC2* (9% de los casos), *SIX3* (5% de los casos) y *TIF* (2% de los casos).

En aquellos casos que presentaban holoprosencefalia o anomalías craneofaciales, y en donde el resultado del cariotipo, QF-PCR y MLPA de las regiones subteloméricas fueron normales, se realizó el estudio molecular del gen ***SHH***. Mediante secuenciación Sanger no se detectaron mutaciones en las regiones codificantes de dicho gen y mediante MLPA empleando el kit p187 específico de este carácter, tampoco se detectaron deleciones o duplicaciones en las regiones analizadas, de entre las cuales se encuentra la región codificante de este gen.

Aunque no se pueden descartar mutaciones en las regiones reguladoras de dicho gen, otros muchos genes están asociados a holoprosencefalia que podrían contener mutaciones que afectasen a la funcionalidad de los mismos, y por tanto, explicar el fenotipo en su caso. En cuanto a los abortos con anomalías craneales generales, podrían verse involucrados mayor infinidad de genes, por lo que la probabilidad de detección de mutaciones en el gen *SHH* en estos casos analizados en este estudio, era relativamente baja.

El cribado de este gen en un amplio espectro de anomalías craneofaciales, tenía la finalidad de conocer la implicación de este gen en restos abortivos con malformaciones congénitas. No obstante, la falta de resultados positivos se debe posiblemente a la imposibilidad de realizar un diagnóstico molecular más dirigido, por la falta de detalle en los datos clínicos aportados en la mayoría de los casos. Aunque la expresividad variable de las anomalías craneofaciales dificulta un diagnóstico clínico más preciso en muchas ocasiones. No obstante, la aportación de la información lo más detallada posible al analista molecular, le permite realizar diseños más eficientes (Gekas *et al.*, 2012).

4.1.4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE ENFERMEDADES MONOGENICAS CON AFECTACIÓN ESQUELÉTICA

En los tres abortos siguientes: AB-1212, AB-1687 (Osteogénesis Imperfecta) y AB-1889 (Ellis Van Creveld) se observa cómo la revaluación clínica, tras aportar todos los datos clínicos, así como el descarte de las anomalías cromosómicas más frecuentemente involucradas en las malformaciones congénitas, fue esencial para elaborar una estrategia molecular dirigida de dichos casos.

Las displasias esqueléticas, constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades, donde se encuentra afectado el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los tejidos óseo y cartilaginoso. Normalmente, estas patologías se manifiestan generalmente con talla baja desproporcionada, aisladas o sistémicas, donde el rango de gravedad de los signos clínicos varía, desde la presencia de signos dismórficos hasta la letalidad ocasionada por el fallo respiratorio (Newman & Wallis, 2003).

La valoración ecográfica prenatal sigue siendo el método de excelencia para la aproximación diagnóstica y seguimiento de las displasias óseas. Si bien la ecografía permite medir los huesos largos desde la décima semana de gestación y las deformidades pueden ser detectadas desde el segundo trimestre, un diagnóstico tardío de una condición letal aumenta innecesariamente los riesgos para la salud física y mental de la gestante. A pesar de los avances en el diagnóstico clínico ecográfico, el diagnóstico preciso de las displasias esqueléticas supone aún un reto considerable, debido a la gran variabilidad de la manifestación clínica de éstas y a su heterogeneidad etiológica. La base biológica de las displasias esqueléticas ha sido elucidada gracias a los avances en genética molecular, que han permitido determinar el tipo de displasia esquelética, confirmando mediante el abordaje molecular la sospecha clínica inicial proporcionada por la evaluación morfológica esquelética (Schramm *et al.*, 2009). Sin embargo, la combinación de una anamnesis completa, una adecuada exploración física y una buena descripción de la radiografía esquelética, permiten diagnosticar la mayoría de las displasias óseas de forma adecuada.

4.1.4.3.1 Osteogenesis Imperfecta

El feto AB-1212 y el AB-1687, referidos desde el mismo centro, presentaban ambos marcadores ecográficos alterados. Tras la interrupción voluntaria de ambos embarazos, fueron diferidos con los siguientes datos clínicos iniciales: displasia esquelética en el caso del AB-1212 y aborto polimalformado en el caso AB-1687. Tanto el cariotipo como el MLPA, empleando los kits específicos de las regiones subteloméricas (p070 y p036), mostraron un patrón normal (46,XY) en ambos casos, por lo que se procedió a la revaluación de los mismos, revisando el material ecográfico, fotográfico y radiológico proporcionado.

-En el caso **AB-1212**, que procedía de una primigesta de 34 años de edad, se detectó ecográficamente, a las 20 semanas de gestación, un diámetro biparietal fetal (BPD) de 49 mm, una longitud fetal de aproximadamente 20 mm y una circunferencia abdominal de 156 mm. Asimismo, se apreció un acortamiento severo y curvatura de fémur (*figura 4.26.*). Teniendo en cuenta estos datos, se diagnosticó inicialmente como displasia esquelética. A las 22 semanas de gestación, la gestante optó por la interrupción del embarazo.

Se llevó a cabo el estudio molecular de las mutaciones más frecuentes asociadas a acondroplasia, hipocondroplasia y displasia tanatofórica, localizadas en las regiones codificantes del gen *FGFR3*, como parte de la rutina diagnóstica establecida para las displasias esqueléticas. Sin embargo, no se detectaron mutaciones en dichas regiones (*ver ANEXO IV*).

-Posteriormente, se remitió el caso **AB-1687**, concebido mediante fecundación *in vitro* y fue indicado como aborto polimalformado (*figura 4.27*). Se solicitaron los datos ecográficos, en donde se detallaba abombamiento y acortamiento severo de ambos fémures en el feto a las 15 semanas de gestación. El diámetro biparietal era de 49 mm, la longitud fetal de 26 mm y la circunferencia abdominal de 159 mm. Los datos ecográficos sugerían una sospecha clínica de Osteogénesis Imperfecta. Además, durante la observación macroscópica del feto se apreció el crepitar del hueso femoral al tacto; sonido característico de la fractura ósea.

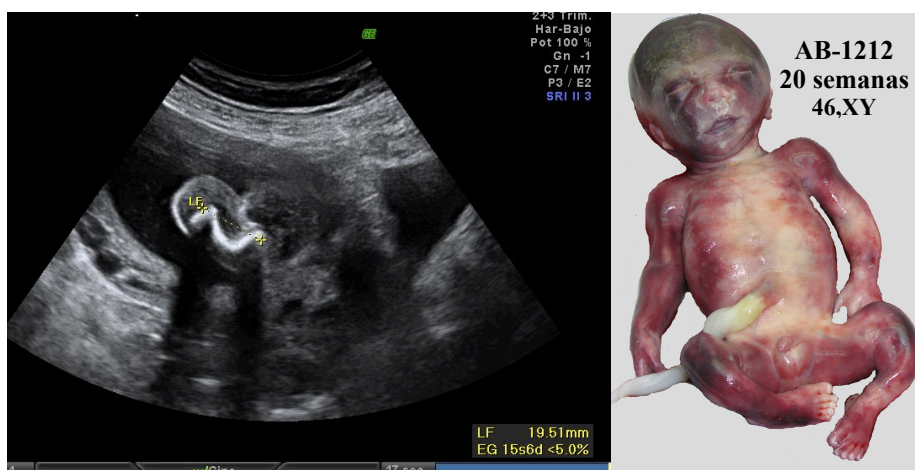


Figura 4.26. Ecografía y fotografía del caso AB-1212.



Figura 4.27. Ecografía y fotografía del caso AB-1687.

Dado que los datos ecográficos de ambos fetos eran aparentemente coincidentes, se procedió a la evaluación exhaustiva radiológica del caso AB-1212 (*figura 4.28*). En la radiografía se observó ausencia del pedículo de la 4ª vértebra lumbar, retraso en la osificación de la columna vertebral lumbar y múltiples fracturas de los huesos largos con una metáfisis expandida; lo que concordaba con la manifestación clínica de Osteogénesis Imperfecta. En los casos donde la sospecha clínica inicial es de displasia esquelética, la ecografía 3D puede aportar información útil adicional y ayudar así a una determinación diagnóstica más precisa (Aerts *et al.*, 2006).

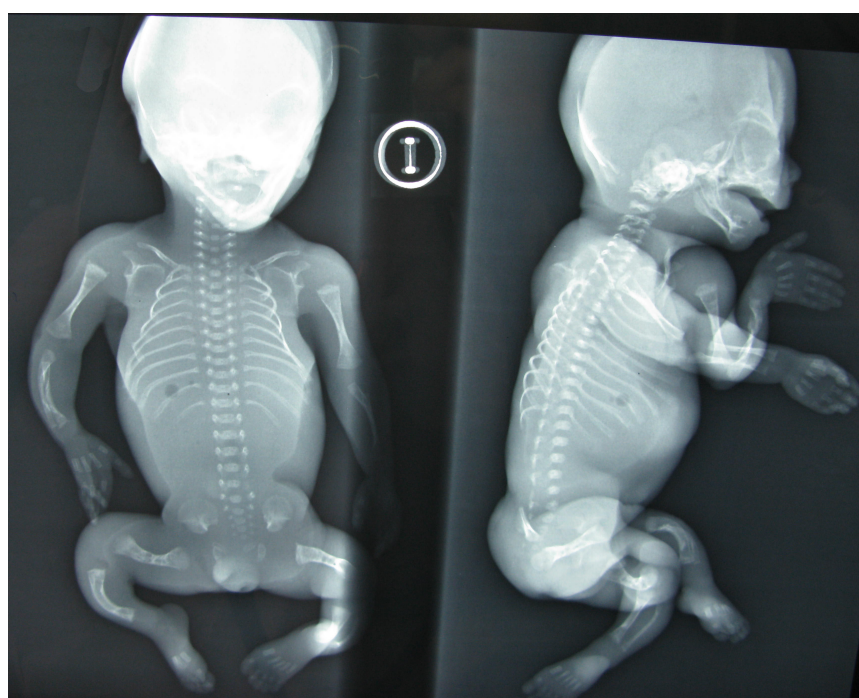


Figura 4.28. Radiografía del caso AB-1212.

Las formas severas de OI se detectan mediante ecografía en torno a las 15-16 semanas de gestación (Raghunath *et al.*, 1994). La OI tipo II es la forma más severa y los individuos afectados mueren en el periodo perinatal. Entre los hallazgos clínicos prenatales de OI tipo II incluye abombamiento de huesos largos y acortamiento de los mismos debido a las múltiples fracturas intraútero.

La mayoría de los casos de OI son debidas a mutaciones autosómicas dominantes en los genes *COL1A1* o *COL1A2* y la recurrencia (6-10%) se atribuye normalmente al mosaicismo germinal (Tongsong *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta que las valoraciones clínicas de ambos fetos presentaban signos compatibles con Osteogénesis Imperfecta, se llevó a cabo el estudio, en colaboración con el centro de procedencia de las muestras, de los genes *COL1A1* y *COL1A2*. Se identificaron en heterocigosis las mutaciones: p.Gly857Ser en el exón 38 del gen *COL1A1* en el aborto AB-1212 (figura 4.29.) y p.Gly269Asp en el exón 20 del gen *COL1A1* en el aborto AB-1687 (figura 4.30.).

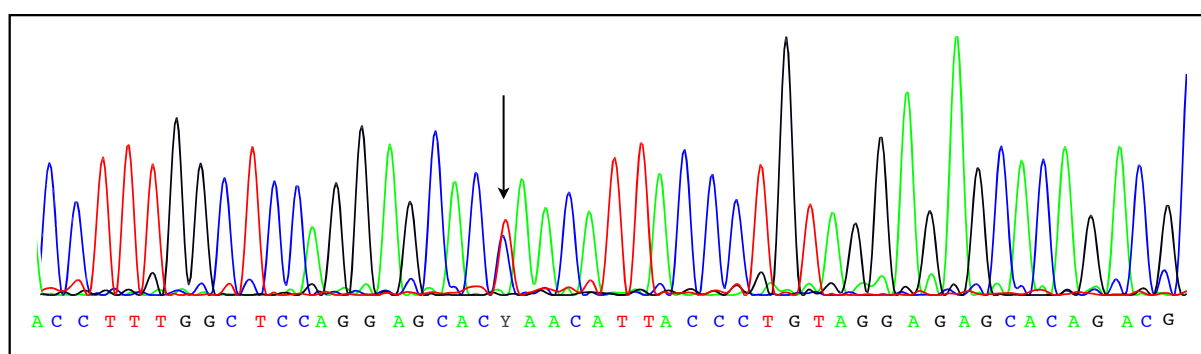


Figura 4.29. Electroferograma de la secuencia reverse del exón 38 del gen *COL1A1* de la muestra del AB-1212.

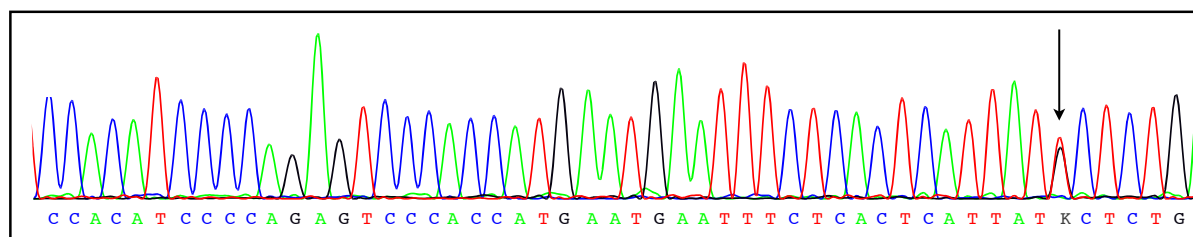


Figura 4.30. Electroferograma de la secuencia reverse del exón 20 del gen *COL1A1* de la muestra del AB-1687.

Hasta la fecha, ninguna de las dos mutaciones han sido descritas con anterioridad. Sin embargo, en el codon 857 y codon 269 se han reportado otras mutaciones, que han sido asociadas a formas leves y severas de OI. En el codon 857 se ha descrito la mutación p.Gly857Cys en pacientes con OI tipo III y tipo IV (Marini *et al.*, 2007) y en el codon 269 se han descrito las mutaciones: p.Gly269Ser asociada a OI tipo I y IV y p.Gly269Val asociada a OI tipo III y IV (Marini *et al.*, 2007).

En los dos abortos, las anomalías esqueléticas fueron detectadas ecográficamente. Este dato insinúa la gravedad de la manifestación fenotípica, por lo que se descartaría las formas leves de OI. No obstante, dado que en ambos casos se trataron de interrupciones voluntarias del embarazo, no se puede determinar el carácter letal al nacimiento, característico de la forma letal OI tipo II, por lo que, tanto el AB-1212 como AB-1687 corresponderían o bien a formas severas o letales de la osteogénesis imperfecta.

Las tres mutaciones descritas en la literatura y las dos mutaciones identificadas en estos casos, se localizan en el dominio de triple hélice del colágeno tipo I y todas ellas consisten en una sustitución de glicina por otro aminoácido. Mayoritariamente, las mutaciones que se han descrito tanto en el gen *COL1A1* como en el gen *COL1A2* afectan al aminoácido glicina, que es esencial en la formación de las fibras de colágeno (Dalglish, 1997), y uno de los principales componentes de las cadenas alfa de las mismas. La presencia de una glicina cada tres aminoácidos es fundamental para la conformación en heterotrímero del colágeno tipo I, ya que es un aminoácido lo suficientemente pequeño, como para ocupar el espacio interior de la hélice que se encuentra restringido químicamente. De esta manera, las sustituciones de glicina por otro aminoácido interrumpen el plegamiento en forma de heterotrímero, exponiendo las tres cadenas a un exceso de hidrolización y glicosilación (Engel & Prockop, 1991).

Estos cambios podrían haberse confirmado mediante estudios funcionales en modelos experimentales, aunque la extrapolación, al ser humano, de los resultados derivados de estos análisis, en ocasiones tampoco es directa. Otro de los análisis que se podría haber empleado son los estudios bioquímicos o histológicos del colágeno, sin embargo, no se encontraban disponibles en el centro, para el estudio de rutina de abortos. No obstante, además del cribado bioquímico la suplementación con estudios moleculares es esencial para el diagnóstico de esta patología debido al elevado ratio de falsos negativos (Cabral *et al.*, 2006).

Para determinar si las mutaciones identificadas en los fetos eran *de novo* o heredadas se procedió al estudio molecular de dicha mutaciones en los padres de cada aborto. Los progenitores de ambos fetos no manifestaban clínica compatible con OI y tampoco presentaban antecedentes familiares de consanguinidad.

En ninguno de los casos los progenitores fueron portadores de las mutaciones, lo que sugería que la aparición de ambas mutaciones en cada feto era *de novo*. No obstante, no fue posible descartar la posibilidad del mosaicismo germinal. Aproximadamente el 60% de las formas leves de OI presentan mutaciones *de novo*, frente al 100% de los individuos con formas letales y severas (Steiner *et al.*, 2005).

Las mutaciones *de novo* representan la forma más extrema de variación genética rara, siendo más deletéreas que las variantes heredadas, debido a que éstas últimas han sido sometidas a una selección evolutiva menos restrictiva. Aunque las frecuencias de las mutaciones *de novo* varían entre los diferentes individuos, las variaciones de un solo nucleótido que ocurren en la línea germinal, presentan un significativo sesgo parental y existe una correlación con la edad del individuo parental. Si las aneuploidías como el síndrome de Down mayoritariamente tiene origen materno y su frecuencia se incrementa con la edad materna, las variaciones de un solo nucleótido *de novo* ocurren con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, incrementándose esta diferencia con la edad paterna. Esta desviación paterna puede explicarse debido al mayor número de divisiones que suceden en la espermatogénesis, a lo largo de la vida fértil del individuo comparado con las oogonias y por lo tanto, puede ocurrir un mayor número de errores acumulativos en la replicación (Veltman & Brunner, 2012). En ninguno de los dos casos fue proporcionada la información de la edad paterna. Hay que destacar la necesidad de recoger no solo la edad materna sino incorporar en los protocolos la información paterna relevante, ya que arroja información adicional.

4.1.4.3.2 Ellis van Creveld

El aborto **AB-1889**, procedente de una primigesta de 32 años de edad, fue diferido al departamento de Genética, a las 21 semanas de gestación, con la indicación de acondroplasia. Esta sospecha clínica inicial fue establecida a partir de la evaluación ecográfica a las 20 semanas de gestación, donde se detectaron las siguientes observaciones: disminución del ángulo fronto-nasal, discreto abombamiento frontal, tórax acortado y deprimido con respecto al abdomen, disminución de la longitud de huesos largos con marcada rizomelia, húmero y fémur arqueados correspondientes a 15 semanas de gestación y polidactilia en ambas manos con desviación cubital de las mismas.

Previamente al análisis molecular, se realizó la captura fotográfica y radiológica del aborto. Las radiografías mostraron: acortamiento de húmeros y fémures con disposición ligeramente arqueada, polidactilia postaxial, hipoplasia de huesos ilíacos, acetábulo en forma en tridente, hipoplasia de las costillas, retraso en la osificación de las vértebras, de las costillas, del calcáneo, del astrágalo, del hueso sacro y de las ramas horizontales de los huesos púbicos (*figura 4.31.*). Esto último podría deberse a las semanas de gestación del individuo AB-1889.

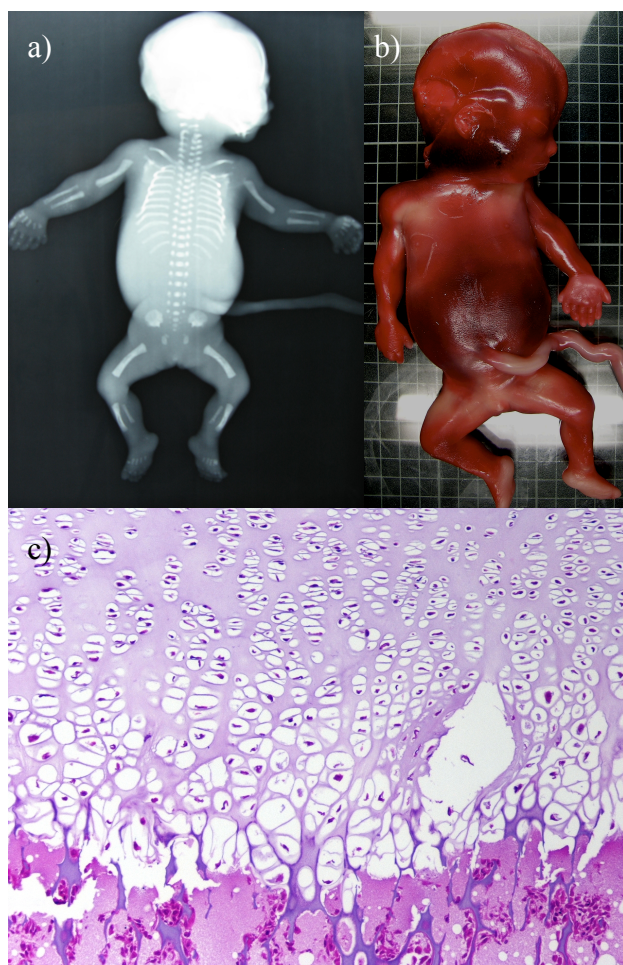


Figura 4.31. Evaluación del caso AB-1889 mediante: a) radiografía donde se observa acortamiento y un ligero abombamiento bilateral de los huesos fémur y húmero, b) fotografía que muestra un feto femenino de 290g de peso y polidactilia en manos y pies y (c) corte histológico que muestra un retraso de maduración del cartilago. Artículo publicado a partir de este trabajo: {PeraitaEzcurra:2012ij}.

En la evaluación anatomopatológica se observó a nivel macroscópico un feto femenino de 290 gramos con datos antropométricos concordantes con la edad gestacional de 21 semanas. El feto presentaba 7 dedos en mano derecha, 7 dedos en mano izquierda, 6 dedos en pie izquierdo, leve abombamiento frontal y un ángulo frontonasal mínimamente disminuido (*figura 4.31.*). En la valoración de los órganos internos se detectó cambios autolíticos de moderados a intensos en las vísceras, así como persistencia de hematopoyesis a nivel hepático. Las gónadas correspondían a ovarios en desarrollo.

En el análisis histológico de las distintas secciones tomadas de la zona de cartilago de crecimiento, mostraron un retraso en la maduración con organización en columnas dentro de los límites de la normalidad (*figura 4.31.*).

Paralelamente, se obtuvo tejido fetal para el análisis citogenético y molecular. Dado que el cultivo celular de dicho tejido no progresó, no se pudo obtener el cariotipo, por lo que la muestra fue analizada a nivel molecular. A continuación, se analizaron genéticamente mediante secuenciación Sanger las mutaciones más frecuentes asociadas a acondroplasia, hipocondroplasia y displasia tanatofórica, localizadas en el gen *FGFR3*, ya que el aborto fue diferido con la indicación de acondroplasia (*ver ANEXO IV*). No se detectaron mutaciones en los fragmentos analizados, como era de esperar por otro lado, teniendo en cuenta que la polidactilia no es característico de la acondroplasia.

Tras haber descartado las mutaciones más frecuentes asociadas a displasias esqueléticas y tras la evaluación de los datos obtenidos de las imágenes radiológicas, histológicas y anatomopatológicas, se diagnosticó clínicamente al aborto AB-1889, de síndrome de Ellis van Creveld. Las anomalías prenatales como tórax estrecho, acortamiento severo de los huesos largos, hexodactilia y defectos cardíacos compatibles con el síndrome de Ellis-van Creveld, se suelen detectar a las 18 semanas (Horigome *et al.*, 1997; Venkat-Raman *et al.*, 2005). Esta patología corresponde al diagnóstico diferencial de los síndromes de costilla corta-polidactilia (CCP), entre los que además del EVC, también se encuentran incluidos los síndromes de Saldino-Noonan, de Majewski, de Verma-Naumoff, de Beemer-Langer y de Jeune (distrofia torácica asfixiante) (Rodríguez *et al.*, 1999). Sin embargo, en este aborto, no se apreciaron el acortamiento de las costillas descrito en los síndromes de Majewski y de Beemer-Langer y los hallazgos anatomopatológicos tampoco son consistentes en el síndrome de Jeune, ya que en éste, existe osificación endocondral que progresa de forma desordenada (Yang *et al.*, 1987). Sin embargo, se han descrito una amplia gama de cambios histopatológicos en estos síndromes que varían dependiendo de la edad del feto en el momento de la evaluación clínica, así como el tipo de tejido analizado (Qureshi *et al.*, 1993). Esto conlleva a que el diagnóstico histopatológico no sea definitivo y los hallazgos radiológicos requieran ser correlacionados con estudios moleculares.

Se analizaron los 21 exones de *EVC* y los 22 exones de *EVC2* mediante secuenciación Sanger y se identificaron dos mutaciones, que producen un cambio de aminoácido por un codon de parada en el gen *EVC2*: la mutación p.Arg677* que fue descrita en 2009 (Valencia et al., 2009) y la mutación p.Trp215* que no se había sido descrita con anterioridad y a raíz de este estudio, se publicó en 2012 (Peraíta-Ezcurra *et al.*, 2012). Este supuso el primer diagnóstico de Ellis van Creveld en un feto de 20 semanas de gestación (Peraíta-Ezcurra *et al.*, 2012).

- La primera mutación, la **p.Trp215*** se genera como consecuencia de un cambio de guanina por adenina en la posición 645 del cDNA (ref seq NM_147127.3) y se localiza en el exón 5 del gen *EVC2* (*figura 4.32.*).
- La mutación **p.Arg677*** se encuentra localizada en el exón 13 y consiste en un cambio de una citosina por una timina en la posición 2029 del cDNA (ref seq NM_147127.3) (*figura 4.33.*).

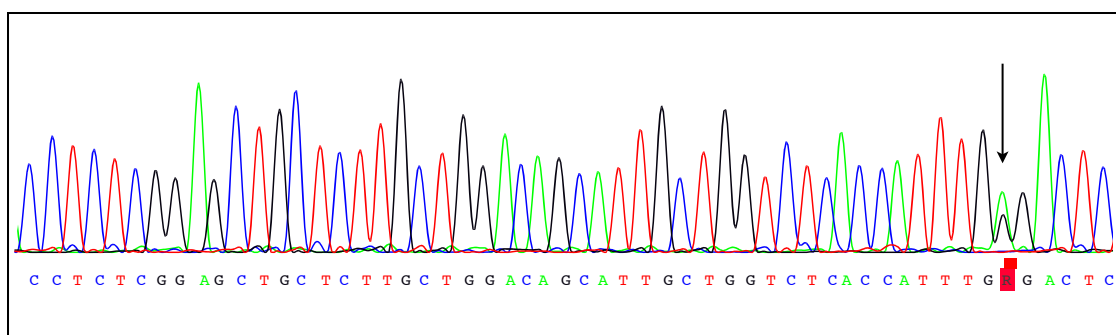


Figura 4.32. Electroferograma de la secuencia forward del exón 5 del gen *EVC2* de la muestra del AB-1889.

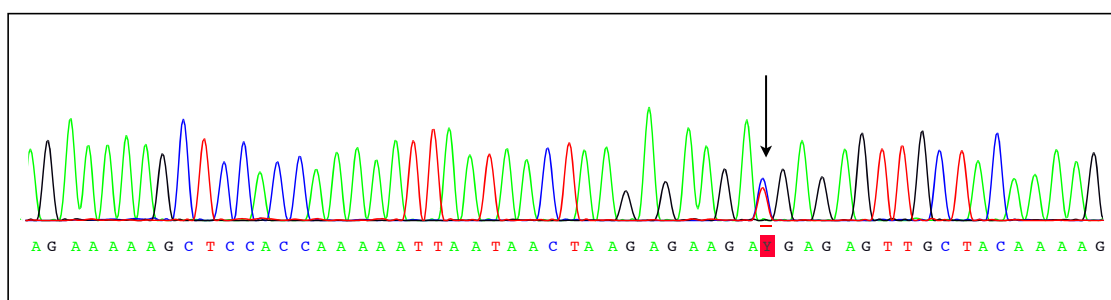


Figura 4.33. Electroferograma de la secuencia forward del exón 13 del gen *EVC2* de la muestra del AB-1889.

Posteriormente, se realizó el estudio de los exones 5 y 13 del gen *EVC2* en las muestras de ADN de los progenitores y se detectó que la mutación p.Trp215* estaba presente en heterocigosis en la muestra materna y la p.Arg677* en heterocigosis en la muestra paterna.

Ambas mutaciones se encuentran localizadas cerca del extremo amino terminal de la proteína EVC2, por lo tanto, se pierde la práctica totalidad de la proteína. *Evc* y *Evc2* son proteínas indispensables para la transducción de la vía de señalización Hedgehog (Hh) en condrocitos y osteoblastos y se localizan en el cilio primario de ambos tipos celulares (Blair *et al.*, 2011). La represión de la ruta Hh en ratones desprovistos de *Evc* altera la maduración de los condrocitos y retrasa tanto la diferenciación de los osteoblastos del collar del hueso, como la formación de la esponjosa primaria (Ruiz-Perez *et al.*, 2007).

La madre del aborto AB-1889 optó por un segundo embarazo espontáneo y en la consulta se le ofertó el diagnóstico genético prenatal. Asimismo, dio su consentimiento para su participación, en el estudio del diagnóstico prenatal no invasivo a partir del estudio de ADN fetal libre en plasma materno, ya que mediante este estudio se podría detectar la presencia o ausencia de la mutación p.Arg677* procedente del padre. De esta manera, se obtuvo 10 ml de sangre materna a las 9 y 12 semanas de gestación para aislar el plasma materno y así extraer el ADN fetal libre en el mismo y se obtuvo una muestra de vellosidad corial a las 12 semanas de gestación.

En el diagnóstico genético prenatal convencional (DP) se secuenciaron los exones 5 y 13 del gen *EVC2* en el ADN extraído a partir de la vellosidad corial (BC-3619) y se detectó la mutación p.Trp215* heredada por vía materna. Por lo tanto, el feto aun siendo portador de una mutación no presentaría el síndrome de EvC. Teniendo en cuenta que en la muestra procedente de la vellosidad corial se detectó la mutación materna, paralelamente se realizó la técnica QF-PCR, a fin de confirmar la procedencia fetal de la muestra BC-3619, descartando así la contaminación materna. Mediante esta técnica, se observó un patrón de varón normal para los marcadores empleados.

Paralelamente, en el estudio de diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI), mediante minisecuenciación, se observó la ausencia de la mutación paterna en las dos muestras de plasma materno. La serie de diluciones artificiales reveló que el umbral de detección de la técnica de minisecuenciación para la mutación era del 5%, concluyendo que los resultados eran concordantes con el diagnóstico genético prenatal convencional. Tras el resultado de ambos abordajes se realizó un seguimiento en la ecografía y el feto no presentó marcadores alterados.

La falta de accesibilidad a muestras de otros familiares, no permitió determinar si las mutaciones surgieron *de novo* o fueron heredadas de ambos progenitores en el aborto AB-1889. Ante la segunda hipótesis, la presencia de estas mutaciones en dos individuos procedentes de la misma región, permitiría postular la idea de que en la población de Extremadura puedan surgir o haber surgido más casos de Ellis van Creveld. Es posible que en esta región geográfica se hayan abortados otros fetos con características similares que no han sido diagnosticados clínicamente, o incluso que hayan nacido bebés con alteraciones sugerentes y que todavía no se hayan confirmado genéticamente.

4.1.5 ABORTOS SIN CARACTERIZAR

El 61% de los casos no pudieron ser caracterizados (*ver ANEXO I*). La falta de caracterización de estos abortos, puede ser debido a la interacción ambiental durante el desarrollo embrionario, a la escasez de datos clínicos de partida para dirigir el estudio adecuadamente, a la falta de información de antecedentes familiares de abortos en gran parte de las gestantes, a la heterogenidad clínica y alélica de los caracteres, y a las limitaciones de resolución de las técnicas empleadas.

En este porcentaje también han sido incluidos los abortos analizados mediante array CGH, ya que en ninguno de los casos se detectó una caracterización genética clara, puesto que esas regiones no fueron descritas en otros individuos con la misma manifestación clínica. Además, dado que no se tenían las muestras de los progenitores, no se pudo descartar que dichas regiones fueran heredadas o *de novo*. Ante la posibilidad de que sean *loci* candidatos para futuros cribados sería necesario más estudios para determinar su patogenicidad.

En los abortos que presentaron una indicación clínica de un determinado síndrome, como fue en el caso de AB-446, y AB-1517, que presentaron la indicación de síndrome de Holt-Oram y Holoprosencefalia respectivamente, tras descartar anomalías cromosómicas, no se detectaron mutaciones o deleciones responsables del fenotipo. En el caso AB-446, se analizó la región codificante del gen *TBX5*, y como se comenta más adelante en el síndrome de Holt-Oram, existe una elevada heterogenidad clínica y alélica (*ver más detalle en pág. 219*). En el aborto AB-1517, se realizó el estudio del gen *SHH* mediante secuenciación y MLPA, aunque tampoco se encontraron mutaciones, deleciones o duplicaciones. Hay que tener en cuenta que en esta manifestación existen otros genes que producen el mismo fenotipo (*ver pág. 37*).

No obstante, tanto en estos dos abortos como en el resto de los fetos no caracterizados, sería recomendable descartar mutaciones en otros genes relacionados con anomalías de miembros, cardíaca, esquelética o craneofacial, pero esta perspectiva debe ser planteada de forma más eficiente analizando las muestras desde plataformas genómicas de detección de mutaciones masivamente.

En algunos casos, se puede sospechar la existencia de la influencia de algún efecto ambiental en la manifestación de la anomalía congénita, como en el caso AB-2036, que presentaba agenesia de mano derecha. La unilateralidad del defecto y la morfología del miembro son sugerentes de la consecuencia de una brida amniótica (*ver más detalle en ANEXO I*).

En ocasiones, en los abortos es difícil determinar con exactitud un síndrome al que poder asociar su fenotipo. En los casos en los que el cultivo celular no progresó, se realizó un análisis de deleciones o duplicaciones de regiones genómicas empleando los kits de MLPA de regiones subteloméricas, de microdeleciones, y los kits de la sospecha clínica de cada caso, por lo que no todas las regiones genómicas fueron analizadas. Por ello, sería necesario establecer el estudio a través de plataformas genómicas para ajustar el diagnóstico genético y establecer la correspondiente correlación genotipo-fenotipo en estos casos.

A partir de la experiencia adquirida en este estudio y observando que la obtención de la información clínica es el paso crucial para análisis genéticos posteriores, se elaboró un modelo de historia clínica (*ver ANEXO II*) para que sirviese a partir de ahora, de guía para los profesionales que atienden en primera instancia a una gestante que presente un feto con defectos congénitos. Dado que la gestante acude en primer lugar a los servicios de Ginecología y Obstetricia para evaluación rutinaria de la gestación, es en ese instante si se detectan anomalías fetales, el momento para poder recoger la información relevante para los análisis posteriores y en los casos en los que se pueda, obtener no solo muestra fetal sino también muestra de los progenitores. Para facilitar la comunicación clínico-paciente se han elaborado en este modelo de historia clínica una serie de preguntas que se consideran indispensables para realizar una historia completa no solo del caso índice sino también de la gestante como por ejemplo: determinar si la gestante ha estado expuesta a teratógenos, si el feto con malformaciones es el primer caso de la pareja o si existen otros casos en la misma o en otros miembros familiares, si existe consanguinidad en la familia, etc.

A raíz de este estudio, se ha valorado que sería interesante realizar estudios epidemiológicos coordinados, centrados en el análisis molecular de genes asociados a malformaciones genética, sobre todo en abortos de segundo trimestre de gestación, para aumentar el conocimiento de la implicación genética en dichas manifestaciones fenotípicas y así aumentar el porcentaje de caracterización de fetos, con la finalidad de ofrecer un adecuado consejo genético a las gestantes y a sus respectivas parejas y/o familiares.

4.1.5.1 ALGORITMO DIAGNOSTICO FETAL

A continuación, se presenta el algoritmo diagnóstico fetal propuesto a partir de la experiencia adquirida en el laboratorio, tras analizar las muestras procedentes de restos abortivos y que se recomienda como guía para poder realizar un estudio genético dirigido eficiente, de tal manera que se incremente el diagnóstico del número de fetos y abortos con defectos congénitos a fin de ofrecer un adecuado consejo genético a la pareja (*figura 4.34.*).

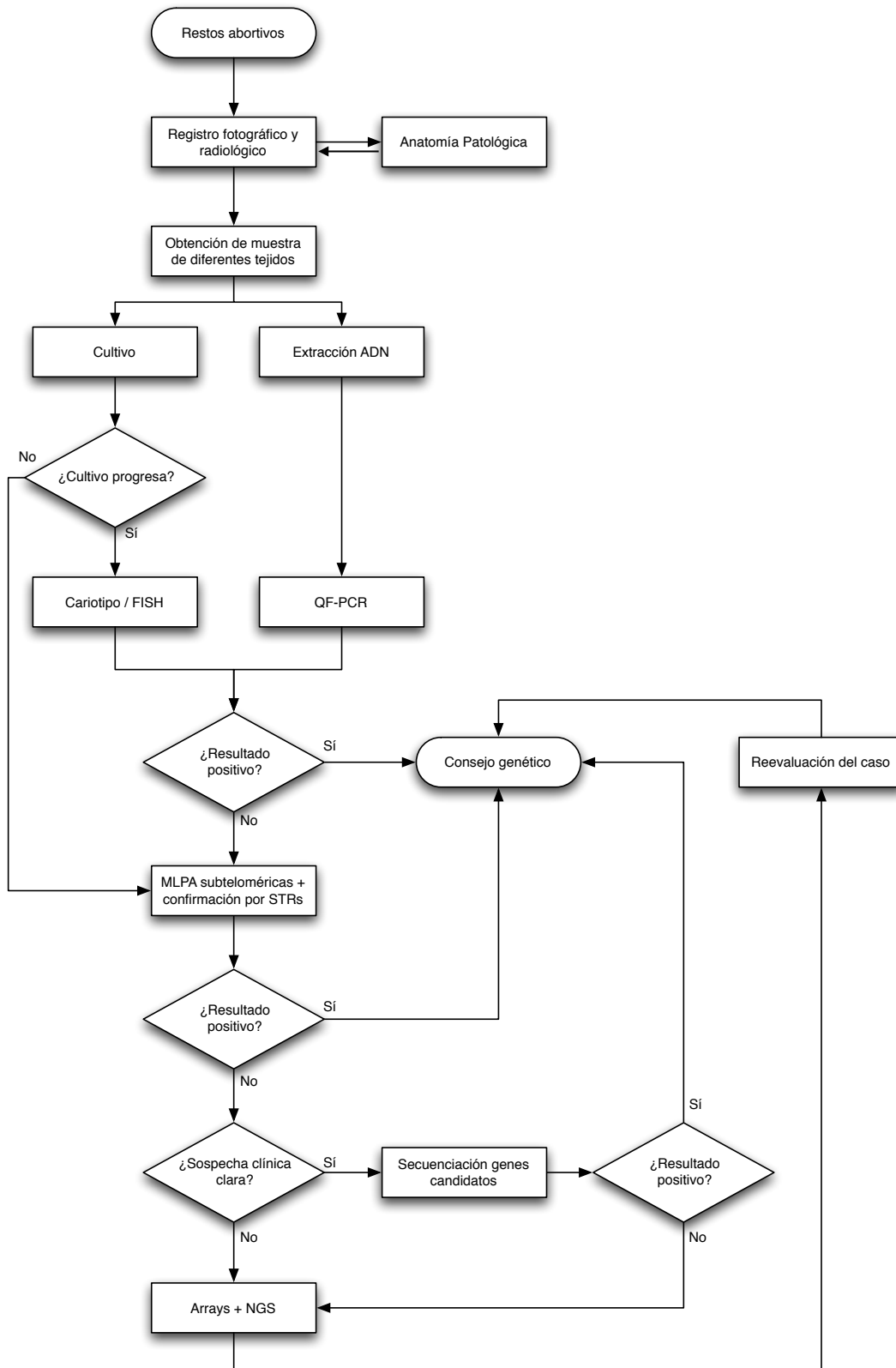


Figura 4.34. Algoritmo de actuación propuesto para el análisis genético de abortos malformados.

4.2 MALFORMACIONES CONGÉNITAS EN INDIVIDUOS CON SÍNDROME RECONOCIBLES

4.2.1 Síndrome de delección 22q11

El síndrome de delección 22q11, no solo corresponde a una de las causas más importantes de los defectos congénitos cardíacos, constituyendo el 5% de todas las anomalías cardíacas detectadas en los recién nacidos vivos, sino también es la segunda causa más frecuente de diagnóstico de retraso mental, constituyendo el 2.4% de todos los pacientes con retraso mental (Rauch *et al.*, 2006).

Se analizaron 9 pacientes que presentaban características fenotípicas compatibles con síndrome de delección 22q11: *facies* peculiar, paladar ojival o hendido, cardiopatía congénita y/o retraso mental. Todos los pacientes fueron analizados mediante MLPA salsa p250, específica para la región 22q11.2, para detectar delecciones o duplicaciones en dicha región.

En 4 pacientes correspondientes a las familias Varios-456, Varios-541, RM-36 y RM-449, se detectó una disminución de entre el 35 y 50% de las sondas (*figura 4.35.*), que abarcaban la región crítica del síndrome de la delección 22q11 (*tabla 4.2.*). El tamaño de la delección para los 4 pacientes correspondía a 3 Mb, siendo la más frecuente en pacientes con esta afectación. La delección de 3 Mb sucede como consecuencia de intercambios cromosómicos aberrantes durante la meiosis (Saitta *et al.*, 2004), mediados por la recombinación homóloga no alélica de secuencias repetitivas de bajo número de copia o LCRs (Low Copy Repeats), concretamente las LCR22A y LCR22D específicas de la región 22q11 (Edelmann *et al.*, 1999b) (*tabla 4.2.*).

Los progenitores de los casos índice de estas 4 familias presentaban un patrón normal en los resultados del MLPA salsa p250. Aunque no se puede descartar que existiese mosaicismo germinal, la mayoría de los casos del síndrome de delección 22q11 presentan delecciones *de novo*. No obstante, en un 5-15% de las delecciones, éstas son heredadas con patrón autosómica dominante (Emanuel, 2008).

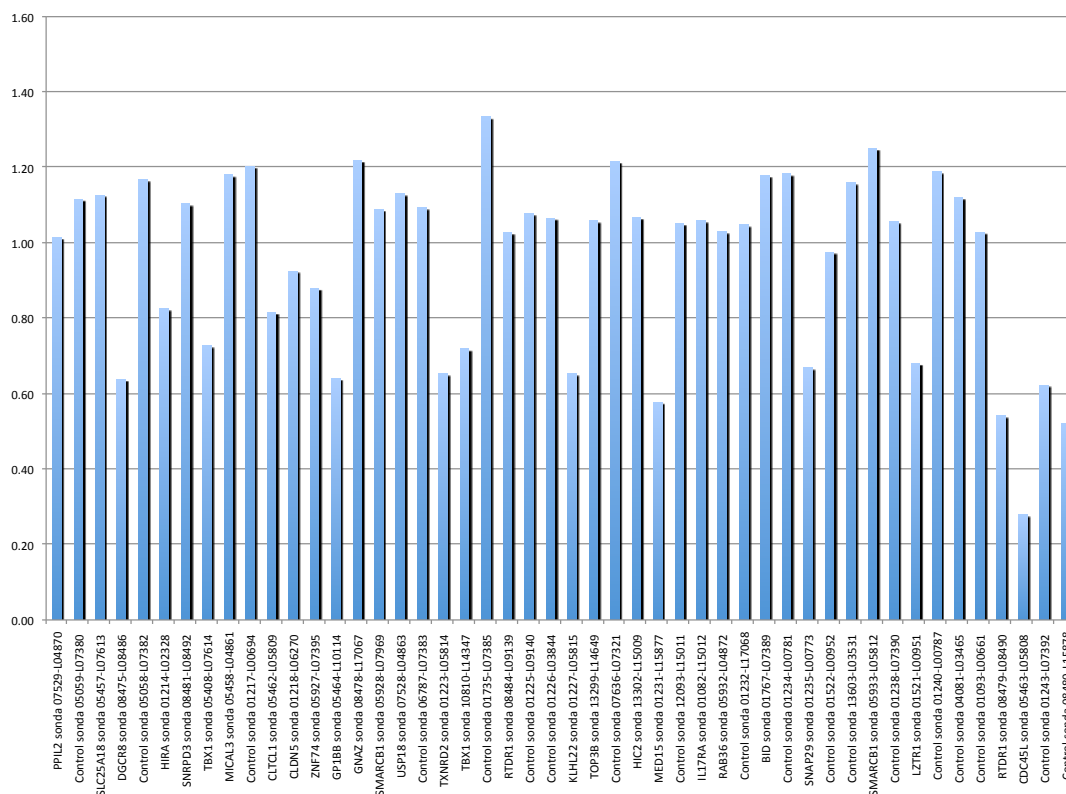


Figura 4.35. Normalización de las áreas de amplificación de las sondas de MLPA del kit p250, en las que se observa una disminución de al menos un 35-50% de las áreas de las sondas asociadas a los genes asociados a la región crítica del síndrome de delección 22q11.2.

Hasta la fecha, no se ha establecido una correlación entre el tamaño o localización de las deleciones o duplicaciones de la región 22q11.2 y el fenotipo. Podría ocurrir que existieran factores epigenéticos modificadores o que estas alteraciones estuvieran enmascarando otras alteraciones genéticas.

Mediante MLPA, no se detectaron duplicaciones en la región 22q11.2 en ninguno de los pacientes. Se han reportado duplicaciones en pocos casos y de un amplio espectro de manifestación clínica, desde fenotipos leves a aparentemente normales, por lo que parece que el diagnóstico clínico de esta condición en estos casos pueda estar sesgado. Esta manifestación leve sugiere que las duplicaciones en esta región de un tamaño de entre 3 y 6 Mb, sean menos deletéreas que las deleciones (Ensenauer *et al.*, 2003).

SONDA	GEN	SECUENCIA PARCIAL DE LA SONDA
Región del Síndrome del Ojo de Gato		
337 1082-L00660	<i>IL17RA</i>	GCAGAGTTATCT-GTCCTGCAGCTG
142 5457-L07613	<i>SLC25A18</i>	GCAGTGAGAAGA-GTCGAGTGAAGC
355 1767-L07389	<i>BID</i>	CTACTGGTGTTC-GGCTTCCTCCAA
178 5458-L04861	<i>MICAL3</i>	GAAGTACCGCCT-GTCCCTGAGGCA
226 7528-L04863	<i>USP18</i>	CTCAGTCCCGAC-GTGGAACTCAGC
inicio de la región crítica del síndrome de delección 22q11		
LCR22-A		
190 5462-L05809	<i>CLTCL1</i>	TGTTGCCTTGGT-GACCGAGACCGC
160 ± 1214-L02328	<i>HIRA</i>	GGAGCTGCTGAA-GGAGCTGCTACC
463 5463-L05808	<i>CDC45L</i>	ATGTTTCGTGTCC-GATTTCCGCAAA
196 1218-L06270	<i>CLDN5</i>	TTCGCCAACATT-GTCGTCCGCGAG
208 5464- L10114	<i>GPIBB</i>	CACAACCGAGCT-GGTGCTGACCGG
172 ± 5408-L07614	<i>TBX1</i>	CCGGGTGAAGCT-TCGCTGGCTGCC
301 ± 7054-L06663	<i>TBX1</i>	TCATGAGCGCCT-TCGCGCGCTCGC
238 » 1223-L05814	<i>TXNRD2</i>	GGAGGGTCAGGA-GAGGAGCTGCAG
148 8475-L08486	<i>DGCR8</i>	GGTAATGGACGT-TGGCTCTGGTGG
LCR22-B		
202 5927-L07395	<i>ZNF74</i>	CAGGCAGATTAT-TCCTCGATGCTG
283 » 1227-L05815	<i>KLHL22</i>	TCTTCGATGTTG-TGCTGGTGGTGG
319 1231-L05816	<i>PCQAP</i>	TGGCATTGGAT-GAAGACACAGGT
LCR22-C		
373 1235-L00773	<i>SNAP29</i>	AGGAGCAAGATG-ACATTCTTGACC
418 1521-L00951	<i>LZTR1</i>	ATGATGAAGGAG-TTCGAGCGCCTC
LCR22-D; fin de la región crítica del síndrome de delección 22q11		
310 ~ 5931-L04869	<i>HIC2</i>	AGGAGGCCGAGG-ACCTGTCAGCAC
130 7529-L04870	<i>PPIL2</i>	GAAGAGCCCTCA-ACCAGTGCCACT
292 5930-L04871	<i>TOP3B</i>	GGTTGCTGAAAA-GCCGTCCTTGGC
LCR22-E		
259 8484-L09139	<i>RTDR1</i>	GGTGTGTCATTT-TGACGTCATCCC
214 8478-L08489	<i>GNAZ</i>	TCACCATCTGCT-TTCCCGAGTACA
454 8479-L08490	<i>RTDR1</i>	CTCCTTGGAGCT-TCCCATTAACAT
343 5932-L04872	<i>RAB36</i>	AGCTGGATGCTT- GGACGCGCCGCT
247 8486-L09342	<i>RAB36</i>	GCAGTCGGTGCT-GCAGGACCTGGA
LCR22-F		
220 5928-L07969	<i>SMARCB1</i>	CTTCGGGCAGAA-GCCCGTGAAGTT
400 5933-L05812	<i>SMARCB1</i>	CATCAGCACACG-GTCCACGAG

Tabla 4.2. Sondas consideradas en el kit p250 de MLPA de la casa comercial MRC-Holland.

En el año 2007, se propuso que las mutaciones de ganancia de función en el gen *TBX1* producían un fenotipo indistinguible del producido por las mutaciones de pérdida de función, que son las que corresponden a las delecciones de la región 22q11.2 (Zweier *et al.*, 2007). A partir de entonces se han ido reportando mutaciones en este gen. En la base de datos HGMD se han descrito hasta la fecha, 22 mutaciones en el gen *TBX1* de las cuales 10, se han asociado a este síndrome y el resto a diferentes fenotipos tales como inmunodeficiencia, tetralogía de Fallot etc (tabla 4.3.)

Fenotipos asociados	Número de mutaciones descritas en el gen <i>TBX1</i>
Síndrome de delección 22q11	10
Defectos cardiovasculares	6
Defecto del septo atrioventricular	1
Inmunodeficiencia	1
Defectos de la línea media facial e hipertelorismo	1
Hendidura oriofacial	1
Tetralogía de Fallot	1
Defecto del septo ventricular	1

Tabla 4.3. Mutaciones descritas en la base de datos HGMD asociadas a los diferentes fenotipos.

En los casos del presente estudio, que no presentaron delección en la región 22q11.2 tras el análisis mediante MLPA, se analizaron mediante secuenciación Sanger las regiones codificantes del gen *TBX1*, a fin de detectar mutaciones que pudieran explicar el fenotipo en los 5 pacientes restantes no caracterizados. El cribado molecular del gen *TBX1* en pacientes adultos permitiría determinar algún fenotipo que podría además haber guiado el estudio en abortos. Sin embargo, no se detectaron mutaciones en las regiones codificantes en el gen *TBX1* en ninguno de los 5 pacientes (tabla 4.4.).

FAMILIA	PACIENTE	PROBANDUS	MLPAp250	TBX1
Varios-207	07/0086	Probandus	negativo	negativo
Varios-327	08/0898 *	Probandus	negativo	negativo
Varios-344	08/1237 *	Probandus	negativo	negativo
Varios-456	10/0329	Probandus	delección 22q11	N/D
Varios-511	10/1167	Probandus	negativo	negativo
Varios-517	10/1230 *	Probandus	negativo	negativo
Varios-541	10/1602	Probandus	delección 22q11	N/D
	10/1600	Padre	negativo	N/D
	10/1601	Madre	negativo	N/D
RM-36	11/0822 *	Probandus	delección 22q11	N/D
	11/0820	Padre	negativo	N/D
	11/0821	Madre	negativo	N/D
RM 449	10/0186 *	Probandus	delección 22q11	N/D
	10/0184	Padre	negativo	N/D
	10/0185	Madre	negativo	N/D

Tabla 4.4. Resumen de resultados de pacientes con sospecha clínica de síndrome de delección 22q11 mediante el empleo del kit específico de este síndrome: columna MLPAp250 y de los resultados tras el análisis mutacional de las regiones codificantes del gen *TBX1*. El asterisco representa las familias cuyo casos índice manifestaron retraso mental. asociadas a los diferentes fenotipos. N/D: no disponible

De todos los pacientes con sospecha clínica de síndrome de delección 22q11 que además, presentaron retraso mental (Varios-327, Varios-344, Varios-517, RM-36 y RM-449) (*tabla 4.4.*) se les aplicó el protocolo de rutina diagnóstica que se aplica de forma general a los pacientes que presentan retraso mental, a saber: cariotipo, MLPA de las regiones subteloméricas (salsas p036 y p070) MLPA de las regiones cromosómicas que se asocian a síndromes de microdelección (salsa p245) y retraso mental (RM1, RM2 y RMX). En estos pacientes se detectó un patrón normal para todos los MLPA empleados.

En nuestro estudio, no se detectó la causa de la manifestación fenotípica en un total de 5 pacientes, pudiendo ser debido a que se realizó exclusivamente un cribado de la región codificante del gen. No obstante, pueden existir variantes ubicadas en regiones reguladoras que pudieran justificar el fenotipo.

En la literatura, los diferentes estudios en los que se analizó el gen *TBX1*, la tasa de detección de mutaciones fue relativamente baja (Chieffo *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2001) y la mayoría de las variantes detectadas, o no se heredaban junto con las características fenotípicas, o los autores no proporcionaban estudios funcionales que justificaran la implicación patológica de dichos cambios. Además, en un estudio más reciente donde se analizaron un total de 1.022 pacientes con fenotipo compatible con síndrome 22q11.2, no se estableció una correlación genotipo-fenotipo entre las variantes identificadas en el estudio y la manifestación cardíaca (Guo *et al.*, 2011).

Otra razón por la que parece no existir una asociación clara es por la posible existencia de factores ambientales modificadores de la expresión del efecto patológico de las mutaciones en el gen *TBX1*, como experimentalmente se demostró en estudios funcionales con ratones que el ácido retinoico inhibía la expresión de *Tbx1* (Roberts *et al.*, 2005).

Por otro lado, *TBX1* no es el único gen que se encuentra en la región comúnmente delecionada en los pacientes con síndrome de delección 22q11.2, por lo que otros genes como *VEGF*, *FGF8* o *Chordin* han sido considerados como buenos candidatos para su estudio (Torres-Juan *et al.*, 2007).

Asimismo, este síndrome solapa con otros síndromes, lo que plantea la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial con (McDonald-McGinn *et al.*, 2013):

-Síndrome Smith-Lemli-Opitz: Este síndrome debe ser tenido en cuenta cuando esté presente paladar hendido o polidactilia.

-Síndrome de Allagile: Este síndrome debe ser estudiado cuando el paciente manifieste hemivértebras, anomalías cardíacas congénitas y embriotoxon posterior .

-Síndrome de VATER: Este síndrome debe ser descartado cuando existan en el paciente defectos renales junto con anomalías de miembros, cardíacas y vertebrales.

-Síndrome Goldenhar: Este síndrome debe ser tenido en cuenta cuando el paciente presente anomalías del pabellón auricular, defectos vertebrales, anomalías cardíacas y renales.

4.2.2 Síndrome de Marfan

El síndrome de Marfan ha suscitado un aumento de interés en los últimos años, por las recientes investigaciones sobre nuevas estrategias terapéuticas. Esta enfermedad presenta una manifestación fenotípica muy heterogénea y de naturaleza multisistémica, lo que precisa de un manejo multidisciplinar. En la actualidad el diagnóstico de la enfermedad se realiza siguiendo los criterios de Gante que han sido recientemente revisados (Loeys *et al.*, 2010).

Se analizaron mediante secuenciación Sanger, un total de 13 familias con sospecha clínica de Síndrome de Marfan. Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el centro de genética médica del Hospital Universitario de Gante (CMGG) y con la empresa Secugen S.L y un total de 2 familias (Marfan 4 y Marfan 8) en las que no se pudo externalizar el estudio del gen *FBNI*, fueron seleccionadas en la fase final de este estudio, para estudio de exoma con secuenciación masiva. Mediante estas tecnologías, se identificó la mutación puntual responsable de la patología en 9 de estas familias, siendo la mayoría de las mutaciones (55%: 5/9), substituciones de un aminoácido por otro diferente (*tabla 4.5*). Esto corresponde con lo que se ha descrito en la literatura y con la base de datos de HGMD donde alrededor del 60% de las mutaciones son de este tipo (Loeys *et al.*, 2001).

Las mutaciones restantes en este estudio consistieron en dos cambios de aminoácido por un codon de parada, una delección de dos pares de bases y una mutación en la región de corte y empalme en el intrón 55 (*tabla 4.5.*).

Todas las mutaciones identificadas en el gen *FBNI* en este estudio, fueron descritas previamente en la literatura, a excepción de la mutación c.6872-14A>G detectada en la familia **Marfan-3** y la mutación c.6058G>T identificada en el individuo afecto de la familia **Marfan-8** (*tabla 4.5.*). La primera consiste en un cambio de adenina por guanina en el intrón 55 que crea un nuevo sitio de corte y empalme y como consecuencia de esto, se añaden 13 nucleótidos al exón 56 en una pauta de lectura diferente generando un codon de parada prematuro en la proteína. La inserción de los 13 nucleótidos fue detectada tras la clonación y secuenciación del cDNA a partir de linfocitos cultivados del paciente, en un estudio colaborativo con el centro de genética médica del Hospital Universitario de Gante (CMGG). La segunda consiste en un cambio de guanina por timina en el exón 51, que conlleva a un cambio de ácido glutámico en un codon de parada, truncándose parte del dominio TB hacia el dominio C-terminal de la proteína.

De las 7 mutaciones que ya habían sido descritas en la literatura, 6 estaban asociadas al Síndrome de Marfan (*tabla 4.5.*) y 1 mutación, la correspondiente a la familia Marfan-5, que consiste en un cambio de Arginina por Cisteína en el codon 1530, fue asociada a Ectopia lentis en 2 pacientes europeos y en un paciente procedente de China (Jin *et al.*, 2007; Loeys *et al.*, 2001). Sin embargo, inicialmente el *probandus* de la familia **Marfan-5** fue diagnosticado clínicamente como síndrome de Marfan. Al detectar la mutación p.Arg1530Cys en el gen *FBNI* en este paciente, la cual estaba asociada a Ectopia Lentis y al reevaluar la información clínica y reajustarla a la última revisión de los criterios clínicos de Gante, finalmente se diagnosticó como síndrome de Ectopia Lentis (ELS). Los pacientes con Ectopia Lentis familiar (ELS) no presentan sintomatología aórtica, pero presentan características esqueléticas similares al síndrome de Marfan, lo que dificulta el diagnóstico en base a la diferenciación con el síndrome de marfan incipiente.

Loeys y colaboradores, en la revisión de los criterios de Gante en 2010, propusieron la designación del ELS a: 1) aquellos individuos que presentando Ectopia Lentis con o sin manifestaciones sistémicas, que tengan una mutación identificada en el gen *FBNI* no asociada a aneurisma aórtica, 2) aquellos pacientes que presenten Ectopia Lentis, sin mutación identificada en el gen *FBNI* (Loeys *et al.*, 2010). En este último supuesto, se podría rebatir la revisión de esta clasificación, dado que no se contemplan otros aspectos etipatológicos del gen *FBNI*, ya que actualmente no se estarían estudiando zonas reguladoras del mismo y esto podría contribuir a la variabilidad fenotípica.

Según se vaya incrementando el estudio de las diferentes regiones en las zonas reguladoras, que el proyecto ENCODE lleva en marcha, se podrá entender mejor la patología y clasificarla en función de otros parámetros, haciendo más hincapié en el punto de vista genético (ENCODE Project Consortium *et al.*, 2012).

A pesar de que se han descrito mutaciones a lo largo de la estructura génica del gen *FBNI*, se ha detectado que mayoritariamente es el dominio cbEGF, el más afectado de la proteína, alterándose una de las 6 cisteínas que están altamente conservadas filogenéticamente (Robinson & Booms, 2001). La unión a calcio por parte de este dominio es dependiente de la estructura terciaria de la proteína, mediada por las uniones disulfuro generadas a partir de estos residuos de cisteína (Nijbroek *et al.*, 1995).

En este estudio se identificaron 4 mutaciones que afectaban al dominio EGF, otras 4 que alteraban el dominio TB y 1 mutación que afectaba a la región carboxilo terminal de la proteína (*tabla 4.5.*). El hecho de que se detectaran el mismo número de mutaciones en el dominio EGF que en el dominio TB, es debido al escaso número de familias analizadas. Probablemente, con un mayor número de pacientes analizados es posible que se pudiera determinar, que el dominio EGF es el más afectado en las familias españolas.

FAMILIA	ADN	PARENTESCO	MUTACIÓN GEN <i>FBNI</i>	DOMINIO	MLPA Salasas p065 y p066	FENOTIPO ASOCIADO A LA MUTACIÓN	REFERENCIA
Marfan-1	07/1518	Probandus	p. Cys2221Phe (c.6662 G>T) en el exón 54	cbEGF	Negativo	Marfan	Arbustini et al; Hum Mut. 1995 Nov; 26(5):494
Marfan-2	07/0763	Probandus	p. Met2347Val/8*18 (c.7039-7040 delAT) en el exón 57	TB	Negativo	Marfan	Körkkö J et al; J Med Genet. 2002 Jan;39(1):34-41
	07/0821	Madre	Negativo	-	Negativo	-	-
Marfan-3	03/0049	Probandus	p. Asp2291Val/8*16 (c.6872-14 A>G IVS55) en el intrón 55	cbEGF	Negativo	Marfan	Este estudio
	04/1199	Padre	Negativo	-	Negativo	-	-
	04/1200	Madre	Negativo	-	Negativo	-	-
Marfan-4	06/0773	Probandus	p. Val2234Met (c.6700 G>A) en el exón 54	cbEGF	Negativo	Marfan	Tjeldhom et al; Genet Test. 2006;10:258
Marfan-5	08/0801	Probandus	p. Arg1530Cys (c.4588 C>T) en el exón 37	TB	Negativo	Ectopia Lentis	Loeys et al; Arch Intern Med. 2001; 161:2447-2454
Marfan-6	08/1367	Probandus	Negativo	-	Negativo	-	-
Marfan-7	09/0404	Probandus	p. Arg2726Trp (c.8176 C>T) en el exón 64	C-terminal	Negativo	Marfan	Milewicz et al; J Clin Invest. 1995 May;95(5):2373-8.
Marfan-8	09/1528	Probandus	p. Glu2020* (c.6058 G>T) en el exón 51	TB	Negativo	Marfan	Este estudio
	09/1527	Padre	p. Glu2020* (c.6058 G>T) en el exón 51	-	Negativo	Marfan	Este estudio
Marfan-9	09/1542	Probandus	Negativo	-	Negativo	-	-
	09/2089	Probandus	p. Arg122Cys (c.364C>T) en el exón 4	cbEGF	Negativo	Marfan	Ståhl-Hallengren C et al; J Clin Invest. 1994 Aug;94(2):709-13
Marfan-10	09/2090	Padre	p. Arg122Cys (c.364C>T) en el exón 4	cbEGF	Negativo	Marfan	Ståhl-Hallengren C et al; J Clin Invest. 1994 Aug;94(2):709-13
	09/2091	Hermana	p. Arg122Cys (c.364C>T) en el exón 4	cbEGF	Negativo	Marfan	Ståhl-Hallengren C et al; J Clin Invest. 1994 Aug;94(2):709-13
Marfan-11	10/0629	Probandus	Negativo	-	Negativo	-	-
	10/0774	Madre	Negativo	-	Negativo	-	-
	10/1754	Probandus	Negativo	-	Deleción completa del gen <i>FBNI</i>	Marfan	Hung C et al; Ann Hum Genet. 2009 Nov;73(Pt 6):559-67.
Marfan-16	11/0853	Hermana	Negativo	-	Negativo	-	-
	11/0854	Hermana	Negativo	-	Deleción completa del gen <i>FBNI</i>	Marfan	Hung C et al; Ann Hum Genet. 2009 Nov;73(Pt 6):559-67.
	11/0855	Madre	Negativo	-	Deleción completa del gen <i>FBNI</i>	Marfan	Hung C et al; Ann Hum Genet. 2009 Nov;73(Pt 6):559-67.
Marfan-17	11/0837	Probandus	p. Arg2057* (c.6169C>T) en el exón 50	TB	Negativo	Marfan	Liu WO et al; Genet Test. 1997-1998;1(4):237-42.
	11/0890	Madre	-	-	Negativo	-	-
	11/0891	Hermanastra	p. Arg2057* (c.6169C>T) en el exón 50	TB	Negativo	Marfan	Liu WO et al; Genet Test. 1997-1998;1(4):237-42.

Tabla 4.5. Resumen de las mutaciones identificadas en el gen *FBNI* en las diferentes familias con sospecha de síndrome de Marfan; la ubicación de las mismas en el dominio proteico de la fibrilina 1; su manifestación fenotípica asociada y la referencia de la publicación donde fueron descritas las mutaciones por primera vez.

Aunque en general no existe una clara correlación entre el genotipo detectado y el fenotipo expresado dada la elevada variabilidad intrafamiliar del síndrome de Marfan, se ha observado que la manifestación fenotípica es más severa cuando las mutaciones se encuentran localizadas entre los exones 24 al 32, denominándose Enfermedad de Marfan neonatal (Faivre *et al.*, 2007). Las mutaciones ubicadas en los exones 1 al 10 parecen correlacionarse con formas sin dilatación aórtica, al igual que el paciente de la familia Marfan-10 cuyo ecocardiograma y ECG fueron normales, y que las mutaciones en los exones 59-65 se asocian con formas cardiovasculares tardías y menores como en el caso del paciente de la familia **Marfan-7** (Robinson *et al.*, 2002).

En los casos en los que se tenía muestra de los progenitores, se segregaron las mutaciones para conocer el origen parental de las mismas, o para determinar si dichas mutaciones podrían ser *de novo*. En dos de estas familias (**Marfan-10** y **Marfan-17**) se confirmó que la mutación fue heredada por uno de los dos progenitores. En cambio, en la familia **Marfan-3**, no se detectaron la mutación en ninguno de los progenitores, sugiriendo que la mutación surgió *de novo* en el individuo afecto, aunque no se puede descartar que no presente mosaicismo germinal. En el resto de los pacientes, o bien solo se disponía de la muestra del *probandus* (**Marfan-1**, **Marfan-5**, y **Marfan-7**) o de la muestra de uno de los dos progenitores (**Marfan-2**), que además no era portador de la mutación. El síndrome de Marfan se hereda mayoritariamente siguiendo un patrón autosómico dominante, no obstante, alrededor de un 25% las mutaciones en el gen *FBN1* son *de novo* (Robinson *et al.*, 2006).

Con el fin de descartar la posibilidad de deleciones o duplicaciones de genes involucrados en el síndrome de Marfan o con patología similar, se realizó la técnica de MLPA empleando así, los kit comerciales p065 y p066, que contienen sondas para los 53 de los 66 exones del gen *FBN1*, para todos los exones del gen *TGFBR2* a excepción del exón 2 y una sonda para el gen *DUT*.

En la familia **Marfan-16** se identificó la delección completa de al menos el gen *FBNI* (figura 4.36.). La delección completa del gen fue asociada al síndrome de Marfan en 2009 (Hung *et al.*, 2009). El fenotipo de los pacientes con delección del gen presentan características clínicas que varían de leves a severas (Hilhorst-Hofstee *et al.*, 2011). Al no generarse la proteína, cabría esperar un incremento de TGF- β al no poder unirse a FBN1, por lo que aparece la sintomatología típica del síndrome de Marfan.

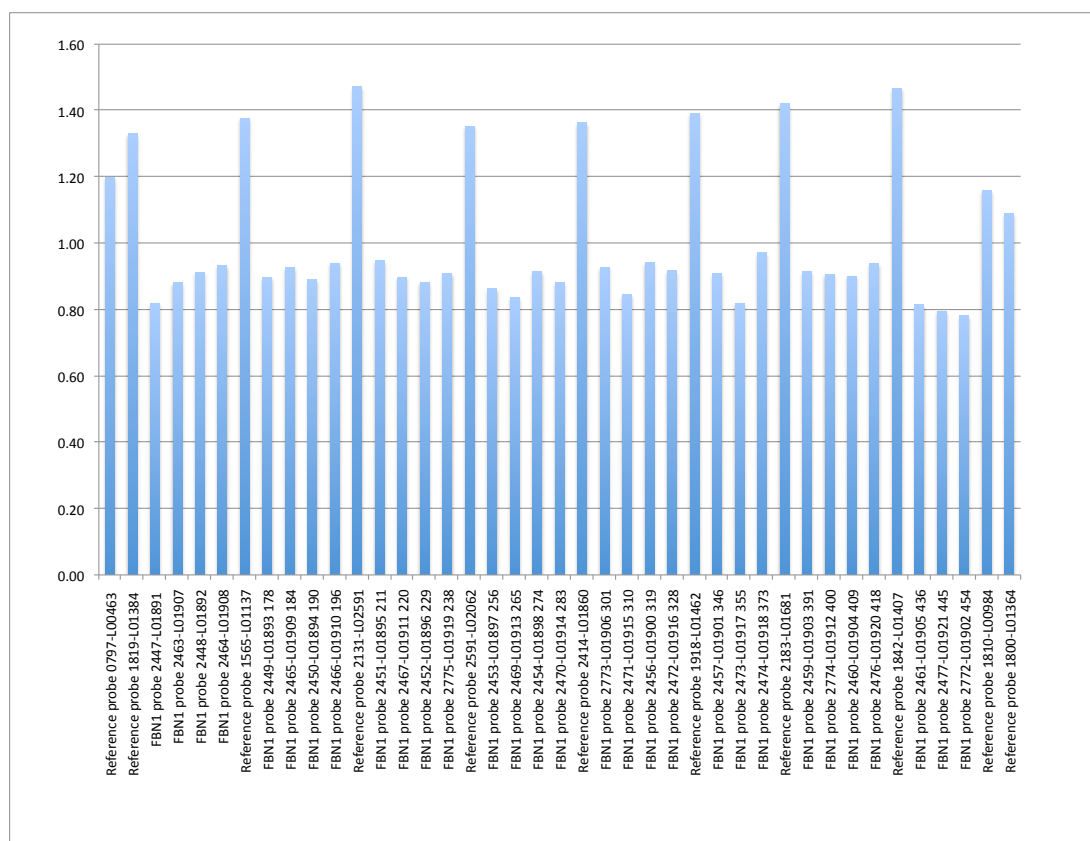


Figura 4.36. Normalización de las áreas de amplificación de las sondas de MLPA del kit p065, en las que se observa una disminución de al menos un 35-50% de las áreas de todas las sondas asociadas al gen *FBNI*.

En las familias **Marfan-6**, **Marfan-9** y **Marfan-11**, no se identificó la mutación responsable de la manifestación fenotípica. Las técnicas empleadas no abarcan las regiones reguladoras del gen *FBNI* y no se ha realizado la secuenciación de genes cuyas mutaciones generan una patología similar al síndrome de Marfan, como son el síndrome de Loeys-Dietz o al aneurisma aórtico familiar (FTAA).

Puesto que el síndrome de Marfan se asocia con una muerte prematura en pacientes sin tratamiento, la realización de un diagnóstico correcto y precoz es de gran importancia. El diagnóstico del síndrome de Marfan en adultos se establece siguiendo los criterios clínicos de Gante, sin embargo, las manifestaciones clínicas en infantes no es completa y por lo tanto, la confirmación del diagnóstico clínico mediante el diagnóstico genético, puede arrojar más información para su futuro seguimiento clínico y para la prevención de la patología mediante tratamiento cardiovascular, pudiéndose beneficiar de las nuevas terapias, como el Losartan.

El Losartan además de ser un antihipertensivo, es un antagonista oral del receptor AT1 de la angiotensina II. El bloqueo del receptor AT1 produce un descenso en la concentración plasmática de TGF β , un descenso en la respuesta celular mediada por diferentes genes relacionados con la manifestación clínica y un descenso en la concentración de mediadores intracelulares de la cascada de señalización del TGF β , como el Smad 2 (Forteza *et al.*, 2011; Lindsay & Dietz, 2011). El mecanismo por el cual, el bloqueo de AT1 antagoniza la ruta de señalización de TGF β , todavía no se encuentra dilucidado por completo. Se cree que la señalización a través del receptor AT1, aumenta la expresión de, tanto del ligando TGF β como de su receptor, e induce también la expresión de trombospodina 1 que es un potente activador de TGF β (Habashi *et al.*, 2006; Lindsay & Dietz, 2011). Además, el losartán no interfiere con el receptor AT2 que, a diferencia del AT1, ejerce una acción intracelular beneficiosa, con efecto antiproliferativo y antiinflamatorio y contribuye a una correcta homeostasis en la pared aórtica (Forteza *et al.*, 2011; Lindsay & Dietz, 2011).

Esta nueva aplicación del Losartán, se encuentra en fase III de los ensayos clínicos. Este ensayo se encuentra en proceso de evaluación de la eficiencia del Losartan versus Atenolol u otros betabloqueantes, en la progresión de la dilatación aórtica en pacientes con síndrome de Marfan (clinicaltrials.gov NCT01145612).

Además, la identificación de la mutación causante de la enfermedad en familias que manifiestan una expresión fenotípica variable, puede ayudar a confirmar el diagnóstico e identificar a las personas de riesgo. A pesar de que la presencia de una mutación en el gen *FBNI* no predice la severidad del fenotipo, sí permite la posibilidad de responder a la demanda del diagnóstico genético prenatal o diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

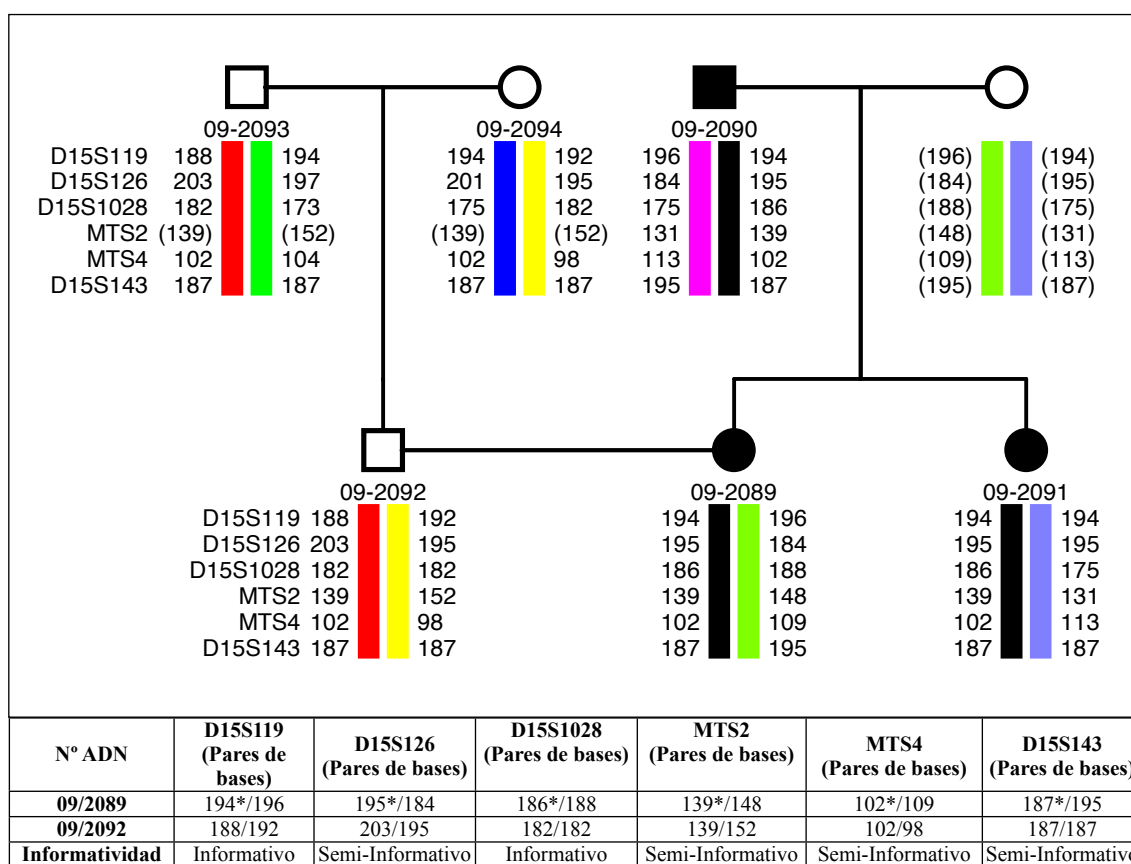
Tras la identificación de las mutaciones causales en las familias **Marfan-10**, **Marfan-16** y **Marfan-17**, éstas solicitaron el estudio genético preimplantacional. Para lo cual, se realizó el estudio de informatividad, como requerimiento previo al DGP, tanto a la pareja implicada como a los familiares de los mismos (*figura 4.36-4.38.*).

En este estudio se emplearon los STRs publicados en 2001 (Judge *et al.*, 2001). Los STRs MTS1, MTS2, MTS3 y MTS4 se encuentran localizados en el interior del gen *FBN1*, mientras que los STRs D15S119, D15S126 y D15S1028 se encuentran localizados en la región cromosómica anterior y D15S143 en la posterior al mismo. Se realizó el estudio de estos microsatélites en estas tres familias identificando para cada una de ellas, el haplotipo portador de la patología.

Posteriormente, se seleccionaron aquellos marcadores informativos y semi-informativos para el posterior diagnóstico genético preimplantacional. Se consideró un microsatélite como informativo aquel marcador donde la combinación de los alelos de la pareja para un determinado marcado permite distinguir el haplotipo afecto en el blastómero y semi-informativo en el que un alelo coincide entre los dos miembros de la pareja y por tanto, no se permite diferenciar el haplotipo afecto en algunas de las combinaciones posibles de los alelos de dicho marcador en el blastómero. Esta situación se da por la imposibilidad de distinguir la situación de una posible homocigosidad o un fallo de amplificación de ese marcador (Allele Drop Out), fenómeno que ocurre con cierta frecuencia en el estudio de célula única (Findlay *et al.*, 1995).

En el caso de la Familia **Marfan-10**, tras la realización del estudio de informatividad (*figura 4.37.*), la pareja se sometió a dos ciclos de DGP. En el primer ciclo, de los 4 embriones seleccionados por el embriólogo, solo uno resultó no portador del haplotipo asociado a la patología, el embrión 3 (E:3), sin embargo, no hubo implantación embrionaria.

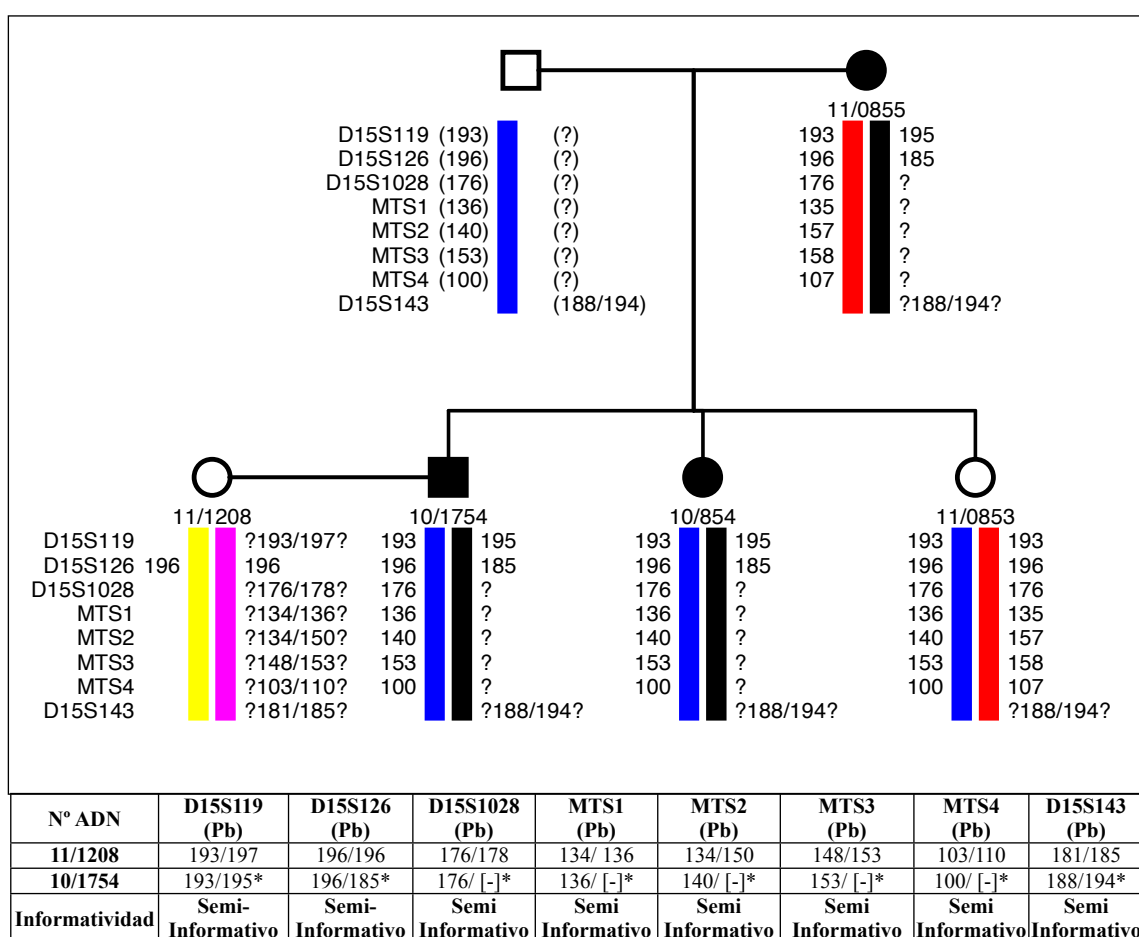
Según el simposio europeo de la reproducción y embriología humana, la tasa de embarazo tras la transferencia de embriones aptos, por cada ciclo de DGP, está en torno al 29% para las enfermedades hereditarias monogénicas. Esta tasa es la más alta en comparación con otras indicaciones como cromosomopatías (Harper *et al.*, 2012). En el segundo ciclo de DGP, dos embriones fueron seleccionados para el estudio genético dos embriones, sin embargo, ninguno de los dos fue apto para la transferencia embrionaria.



(*) alelo patológico / Haplotipo obtenido por comparativa familiar

Figura 4.37. Estudio de haplotipos de la familia Marfan-10 en la que se representa en negro el haplotipo portador de la patología. En la tabla inferior se muestra el estudio de informatividad en la pareja solicitante para cada uno de los microsatélites.

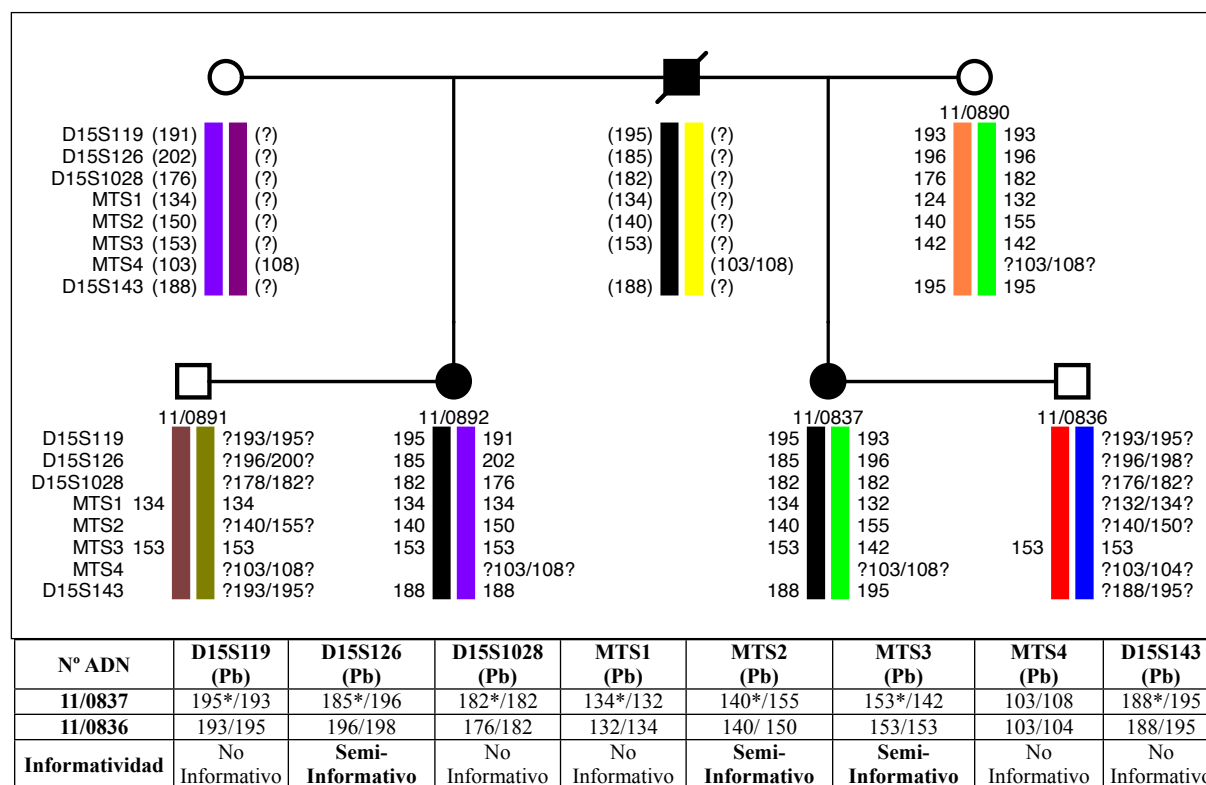
En la familia **Marfan-16**, tras el envío del informe y por motivos personales de la pareja decidieron no continuar con el procedimiento. Sin embargo, gracias al estudio de la informatividad ya realizado para el *probandus* y su pareja (*figura 4.38.*), al requerirse estudiar a los familiares para conocer el haplotipo asociado a la enfermedad, la hermana de éste (ADN 10/0854) correspondiente al individuo III-4 de la familia Marfan-16, podría beneficiarse del diagnóstico genético preimplantacional en caso de que lo solicitara. En este caso solo se requeriría la muestra de su pareja, puesto que ya estarían identificados los alelos de la persona afecta. Según el simposio europeo de la reproducción y embriología humana, la tasa de embarazo tras la transferencia de embriones aptos, por cada ciclo de DGP, está en torno al 29% para las enfermedades hereditarias monogénicas. Esta tasa es la más alta en comparación con otras indicaciones como cromosomopatías (Harper *et al.*, 2012).



(*) alelo patológico / Haplotipo obtenido por comparativa familiar. [-] alelo delecionado. (?) alelo desconocido, ? deleción

Figura 4.38. Estudio de haplotipos de la familia Marfan-16 en la que se representa en negro el haplotipo portador de la patología. En la tabla inferior se muestra el estudio de informatividad en la pareja solicitante para cada uno de los microsatélites.

En el caso del **Marfan-17**, tanto el individuo III:3 (muestra 11/0892) como el individuo III:6 (muestra 11/0837) solicitaron el estudio genético preimplantacional. Por lo que se realizó el estudio de informatividad a ambos, a sus respectivas parejas, así como a los respectivos familiares, a fin de detectar el haplotipo asociado a la patología (*figura 4.39.*). El individuo III:3 y su pareja fue la única en someterse al proceso de DGP y se sometieron a dos ciclos. En el primer ciclo de DGP de esta pareja el proceso no continuó, debido al fallo en el desarrollo del embrión, al igual que en el segundo ciclo, donde se frenó el procedimiento por folículo persistente. Finalmente, esta pareja decidió optar por el embarazo espontáneo y actualmente se encuentra en gestación.



(*) alelo patológico / Haplotipo obtenido por comparativa familiar.

Figura 4.39. Estudio de haplotipos de la familia Marfan-17 en la que se representa en negro el haplotipo portador de la patología. En la tabla inferior se muestra el estudio de informatividad en la pareja solicitante para cada uno de los microsatélites.

El embarazo y el puerperio son periodos de alto riesgo para mujeres con Marfan, debido al estrés en la pared arterial secundario a la circulación hiperdinámica e hipervolémica y al efecto estrogénico (Task Force members *et al.*, 2003). Aunque esto puede aparecer independientemente del diámetro de la raíz aórtica. Por otro lado el riesgo de rotura, es directamente proporcional al diámetro de la aorta, siendo del 1% en mujeres con diámetros menores a 40 mm y del 10% en mujeres con diámetros mayores de 40 mm (Meijboom *et al.*, 2006). Debe realizarse un estricto control del embarazo a estas mujeres, prestando atención al riesgo materno de complicación cardiovascular y obstétricas, que incluyen parto prematuro (por rotura prematura de membranas e incompetencia cervical) y mortalidad fetal (Meijboom *et al.*, 2006). Habiendo a cuenta de estas circunstancias, el tratamiento farmacológico adecuado en mujeres con síndrome de Marfan que se encuentran en periodo gestacional se sustituir Atenolol por Labetalol o Metoprolol, ya que el Atenolol parece disminuir el crecimiento fetal (Goland & Elkayam, 2009).

4.2.3 Displasia Oculodentodigital

Los pacientes II:2 y II:3 de la familia **Varios-434**, fueron remitidos al servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz con una petición de diagnóstico genético preimplantacional. En esta pareja, el varón manifestaba displasia oculodentodigital, que fue diagnosticada clínicamente y confirmada genéticamente. En cuanto a los antecedentes familiares de la mujer (II:3), un familiar presentaba manifestaciones clínicas de retinosis pigmentaria autosómica recesiva, sin embargo, ella no presentaba sintomatología.

El individuo II:2 presentaba la mutación p.Arg148Gln localizada en el exón 2 del gen GJA1, que consistía en un cambio en heterocigosis de arginina por glutamina en el codon 148, debido a una sustitución en heterocigosis de una guanina por adenina en la posición 443 del cDNA (*figura 4.40.*). Esta mutación fue previamente descrita asociada a displasia oculodentodigital en el año 2004 (Richardson *et al.*, 2004) y además, en este mismo codon se describió otra mutación: p. Arg148Gly (Paznekas *et al.*, 2009) Ambas mutaciones se localizan en el dominio citoplasmático de la proteína conexina 43.

Aunque, esta región varía entre las diferentes conexinas, estas mutaciones afectan a aminoácidos conservados durante la evolución y parece que cualquiera de las mutaciones descritas hasta la fecha en el gen *GJAI*, parecen afectar a la formación de los hemicanales que dan lugar a las uniones Gap o podrían afectar a la permeabilidad de las mismas (Richardson *et al.*, 2004).

Durante la consulta, se advirtió que los pacientes no conocían todas las posibles opciones reproductivas que disponían en su caso. Por lo tanto, se les comunicó las opciones adicionales al diagnóstico genético preimplantacional, como son: el diagnóstico prenatal convencional, la inseminación con semen de donante y la adopción, tal y como se determina en la Ley 14/2007 de 3 de julio. Teniendo en cuenta que la mutación se encontraba presente en el miembro varón de la pareja, el diagnóstico prenatal no invasivo, mediante el estudio de ADN fetal a partir de plasma materno, era factible. Por lo que se les planteó adicionalmente esta opción, en el caso de que optaran por una gestación natural. Tras conocer, valorar y comprender la información recibida en la consulta de consejo genético, optaron por la concepción espontánea y posterior diagnóstico prenatal. Asimismo, la pareja accedió a la participación en el estudio de investigación de diagnóstico prenatal no invasivo.

En primer lugar, se llevó a cabo la confirmación de la presencia de la mutación p.Arg148Gln en el varón (*figura 4.40.*) y la ausencia de la misma en la mujer (*figura 4.41.*), mediante secuenciación Sanger de la región de interés, a fin de establecer las condiciones de amplificación requeridas en nuestro laboratorio.

El cambio p. Arg148Gln, aunque también se halla presente en el pseudogen GJA1 (GJA1P1) localizado en la región cromosómica 5q21-q22 y comparte una homología del 97% con el gen *GJAI*, se excluyó la posibilidad de la coamplificación del pseudogen, ya que se emplearon cebadores que así lo impedían y además, no se detectaron ninguno de los otros cambios localizados en el pseudogen en la secuencia analizada.

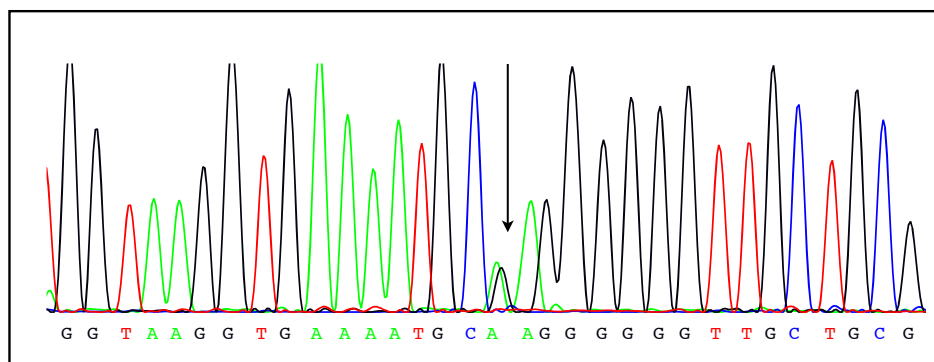


Figura 4.40. Electroferograma de la mutación *p.Arg148Gln*, localizada en el exón 2 del gen *GJA1* y confirmada su presencia en el individuo II:2 de la familia varios-434 mediante secuenciación Sanger.

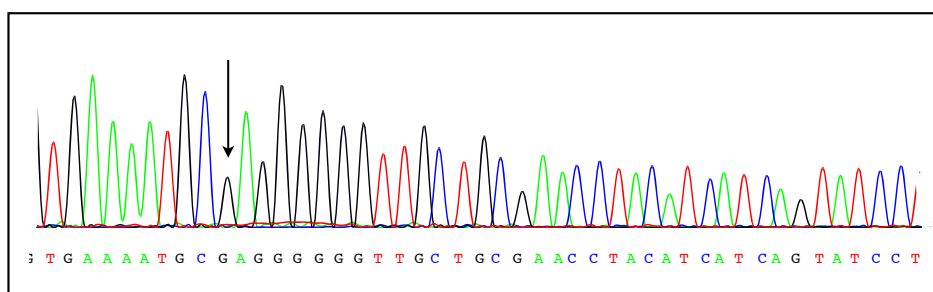


Figura 4.41. Electroferograma de la secuencia del exón 2 del gen *GJA1*, en la que se muestra la ausencia de la mutación *p.Arg142Gln* en el individuo II:3 de la familia varios-434.

En la sangre materna, durante el periodo de gestación se ha descrito que hay presencia de ADN fetal entre 9-20% (Tsui *et al.*, 2011). Dada la coexistencia entre ADN fetal y materno, este estudio puede realizarse en la actualidad, únicamente en mutación de herencia paterna para poder diferenciarla en la fracción fetal. Debido a la baja proporción y al estado de fragmentación del ADN fetal frente al materno, la sensibilidad de la técnica molecular que se vaya a emplear debe ser alta para lo cual se suele emplear la minisequenciación. Además, es necesario validar el procedimiento empleado, y utilizar controles internos que demuestren la existencia de ADN fetal para evitar falsos negativos. Tras el embarazo espontáneo de la gestante (II:3) se recogió una muestra de 10 ml de sangre materna en un tubo con EDTA a las 7 y 9 semanas de gestación para el abordaje de diagnóstico prenatal no invasivo.

Posteriormente, a las 12 semanas de gestación el servicio de ginecología y obstetricia de la Fundación Jiménez Díaz, realizó la biopsia corial obteniendo la muestra BC-3436. Posteriormente, se aisló y purificó el ADN de la vellosidad, para llevar a cabo el diagnóstico genético prenatal. En esta muestra se pudo comprobar mediante secuenciación Sanger y mediante minisequenciación, la ausencia de la mutación paterna (*figura 4.42*).

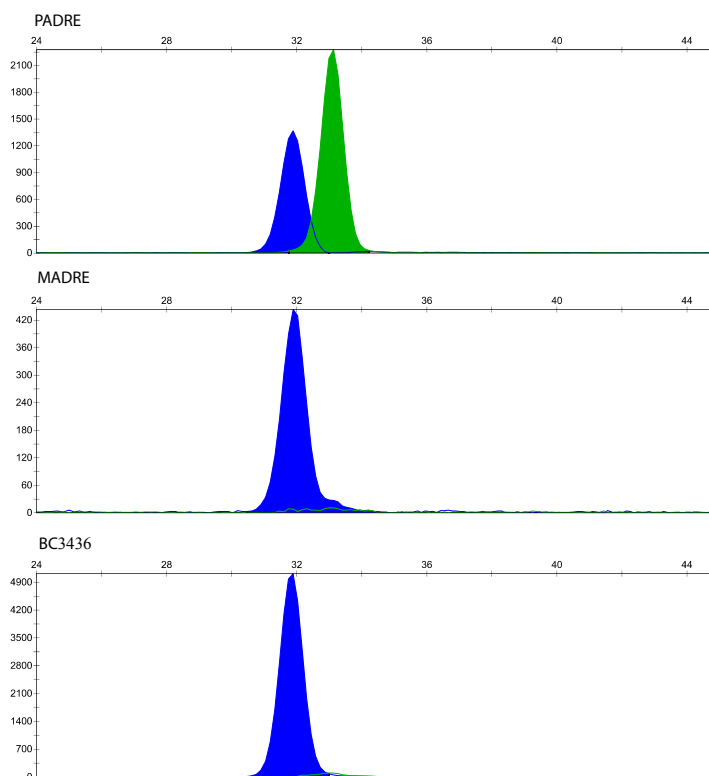


Figura 4.42. Minisequenciación de la mutación *p.Arg138Gln* analizando la muestra fetal BC-3436 y la de sus progenitores individuos II:2 (indicado como padre) y II:3 (indicado como madre) de la familia varios-434. El fluorocromo marcado en FAM (azul) muestra el alelo silvestre y en VIC (verde) el alelo mutante.

Además, simultáneamente se realizó la técnica QF-PCR no solo para confirmar el origen fetal de la vellosidad corial, siguiendo las recomendaciones de calidad del European Molecular Quality Network (EMQN); sino también, para realizar el cribado rápido de aneuploidias, debido a la edad elevada de la gestante (37 años), empleando para ello, microsatélites localizados en los cromosomas 13, 18, 21, X, Y, que a su vez, permite la determinación del sexo fetal. La información resultante del análisis por STRs mediante QF-PCR confirmó el origen fetal de la muestra y el feto presentó un patrón de varón normal para los marcadores empleados.

Paralelamente, se realizó el diagnóstico prenatal no invasivo, amplificando la región exónica donde se encuentra la mutación y aplicando la técnica de minisequenciación para el estudio de la mutación en el ADN fetal. Dado que la QF-PCR había revelado un patrón varón, se estudió además de la mutación paterna, un nucleótido localizado en el gen SRY (Bustamante-Aragones *et al.*, 2008), para demostrar la presencia de ADN fetal. Con la finalidad de estimar la sensibilidad de detección de la mutación, se realizaron mezclas artificiales de ADN paterno y ADN materno, a porcentajes decrecientes de ADN paterno. De esta manera, se simulaban las condiciones de detección de la mutación, en función de la concentración de ADN fetal en el ADN materno, que a su vez su concentración varía en función de las semanas de gestación.

El límite de detección en la batería de diluciones fue entorno al 5% del total de la muestra (ADN paterno más ADN materno) para la presencia de la mutación y del 2% del total de la muestra para la detección del SNP (*figura 4.43.*). En el posterior estudio del plasma materno se obtuvo la presencia del gen SRY mediante qPCR empleando la sonda Taqman previamente descrita por nuestro grupo (Bustamante-Aragones *et al.*, 2008) y la ausencia de la mutación paterna. Estos resultados confirmaron el resultado de estado sano del feto y el sexo masculino de la muestra fue concordante con el obtenido mediante el diagnóstico prenatal.

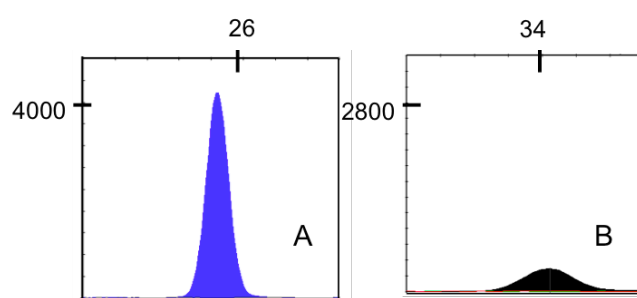


Figura 4.43. Minisequenciación del límite de detección de la mutación *p.Arg138Gln* (imagen izquierda) y del nucleótido del cromosoma Y (imagen derecha).

De esta manera, este diseño específico y personalizado para detectar esta mutación de forma temprana y no invasiva ha permitido que no solo esta pareja pueda optar a esta opción reproductiva en gestaciones posteriores, sino que también está disponible para cualquier otro paciente que siendo varón presenten la misma mutación. Hay al menos dos familias en el mundo que también podrían beneficiarse de dicha alternativa (Richardson *et al.*, 2004).

4.2.4 Displasia acromesomélica tipo Grebe

El probandus de la familia **ACH-247** (individuo II:1) correspondía a un niño de 4 años y 9 meses de estatura de 78 cm ($p < 2$) y un perímetro cefálico de 47,5 cm ($p < 2$) con un aceptable nivel de comprensión aunque con muy baja expresión oral; características clínicas compatibles con el síndrome de Grebe. Las malformaciones clínicas observadas se localizaban en extremidades y concretamente en zonas mesoacromélicas (*figura 4.44*).

Presentaba:

- Acortamiento bilateral severo de antebrazos con típico patrón acromesomélico con zonas proximales, humeral y femoral, sin apenas afectación y zonas meso y acromélicas severamente afectadas.
- Hipoplasia bilateral de manos, y zona de falange distal mayor que proximal.
- Gran acortamiento de zona tibial-peroneal en extremidad inferior más grave que en extremidad superior.
- Pies varos que no se modifica a la movilización pasiva. Incapacidad para andar, aunque se mantenía en postura de pie-semisentado.
- Limitación importante a la extensión de rodillas e hipoplasia severa de ambos pies, con deformidad de dedos.



Figura 4.44. Radiografía de los miembros inferiores y superiores del caso índice (II:1) de la familia ACH-247.

Para confirmar la sospecha clínica de la displasia acromesomélica tipo Grebe (AMDG), se estudió la muestra de ADN: 11/1265 (*probandus*), mediante secuenciación del exón 2 del gen *CDMP-1*. El exón 2 es el único exón que codifica la proteína GDF-5 (factor de crecimiento/diferenciación 5) y por lo tanto, es el único susceptible de presentar mutaciones que ocasionen un cambio de aminoácido o codon de parada prematuro. Tras el estudio molecular, se identificó en la muestra 11/1265, el cambio p.Arg377Trp (c.1129C>T) en homocigosis (*figura 4.45.*).

Este cambio fue estudiado a su vez en los progenitores (ADN: 11/1264 y 11/1243), siendo detectado en ambos el cambio p.Arg377Trp en heterocigosis (*figura 4.46.*), confirmándose así, el estado de portadores para esta substitución nucleotídica. El padre del *probandus* presentaba manifestación clínica leve, como acortamiento de dedos, por lo que concuerda con lo que se ha descrito para algunos portadores de mutaciones en el gen *CDMP-1* (Costa *et al.*, 1998).

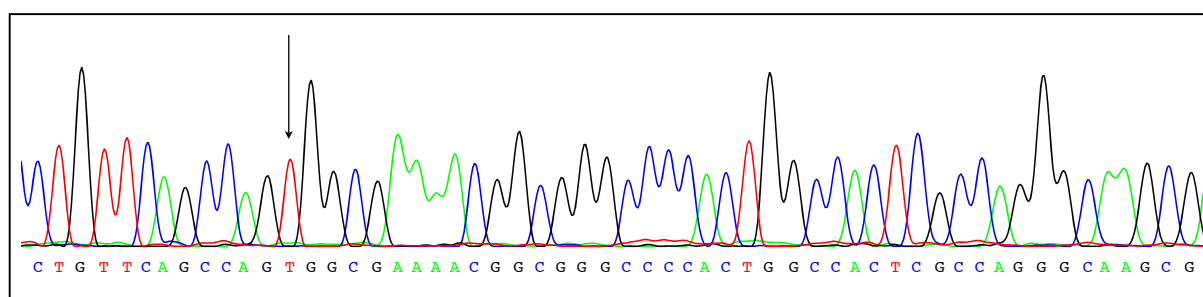


Figura 4.45. Electroferograma de la mutación p.Arg377Trp (indicada con una flecha) en homocigosis en el gen *CDMP-1* a partir de la muestra de ADN: 11/1265 del individuo II:1 de la familia ACH-247.

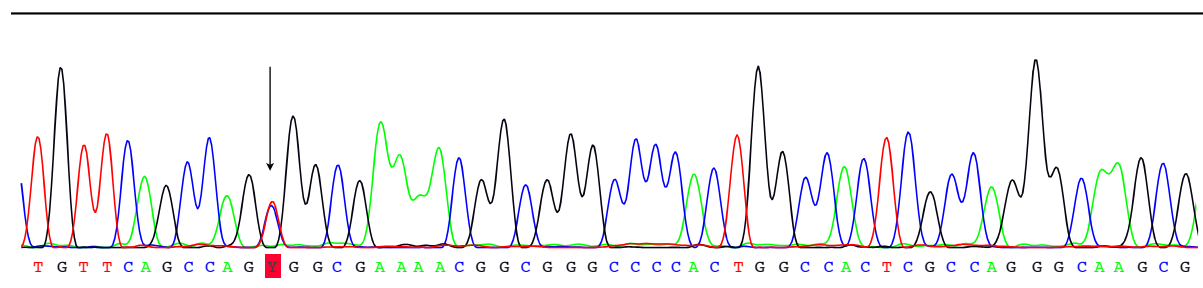


Figura 4.46. Electroferograma de la mutación p.Arg377Trp (indicada con una flecha) en heterocigosis en el gen *CDMP-1* a partir de las muestras de ADN: 11/1264 y 11/1243 de los progenitores del individuo II:1 de la familia ACH-247. Ambas muestras coinciden en ser portadores de esta mutación.

El cambio p.Arg377Trp no estaba descrito con anterioridad en la literatura, por lo tanto, para estudiar el grado de implicación de este cambio en la proteína, se emplearon las herramientas bioinformáticas SIFT y PolyPhen. Ambas predijeron que este cambio era probablemente patológico, con un valor 0 según SIFT y con un valor de 1.000 según Polyphen, siendo los máximos valores para ambas herramientas.

Flanagan y colaboradores determinaron que la sensibilidad diagnóstica de SIFT y PolyPhen correspondía al 69% y 68% y una especificidad del 13% y 16% , respectivamente y demostraron que predecían mejor el defecto que la ganancia de función. No obstante, dada la baja especificidad de ambas herramientas bioinformáticas, las predicciones estimadas deben ser por tanto, interpretadas con cautela (Flanagan *et al.*, 2010).

Además, para confirmarlo de manera adicional, se realizó un análisis informático de la conservación del aminoácido afectado (*figura 4.47.*), ya que normalmente un cambio en un aminoácido que está conservado filogenéticamente suele ser patogénico.

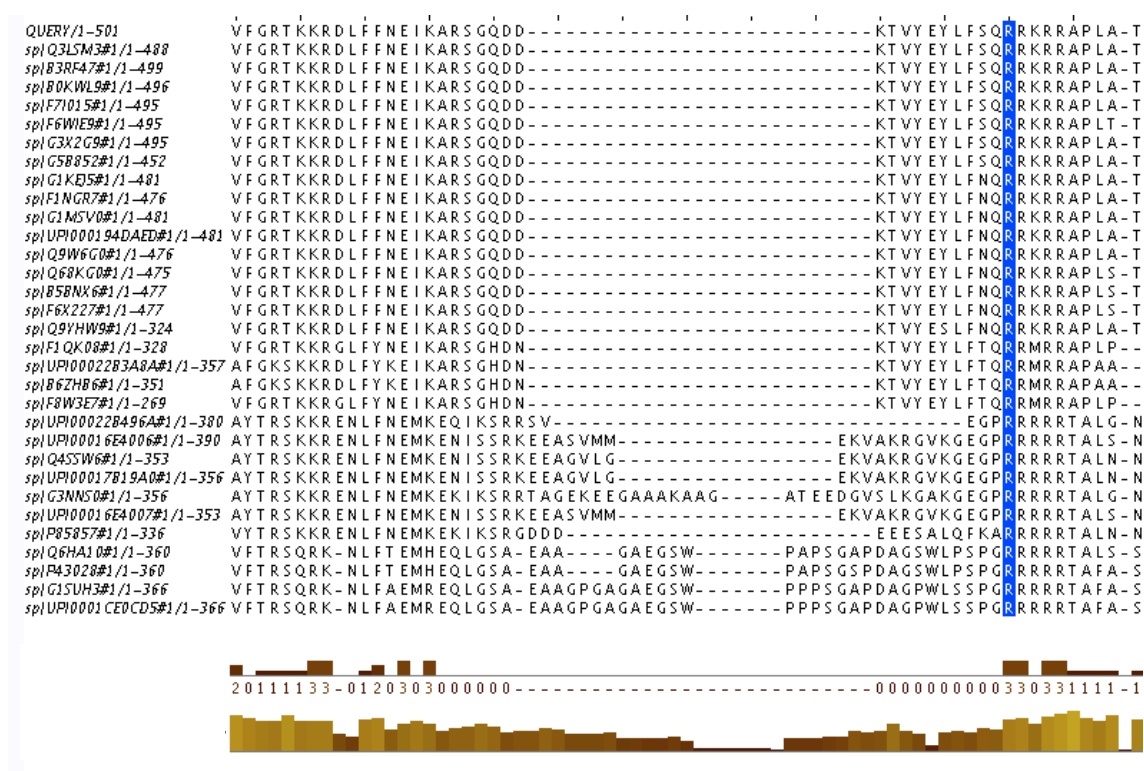


Figura 4.47. Análisis de conservación filogenética del aminoácido Arginina en la posición 377 (sombreada en azul) de la proteína CDMF-1 en diferentes especies.

El cambio p.Arg377Trp identificado en la familia ACH-247, se encuentra situado en la que la secuencia de reconocimiento de las endoproteasas RKR⁺R que cambia a WRKR⁺R (*figura 4.48*). Esto sugiere que podría estar afectando al procesamiento proteolítico y podría provocar que no se generase una proteína madura activa alterando así su función proteica. Esta teoría se ve apoyada por otras publicaciones donde han detectado cambios similares en aminoácidos vecinos como las mutaciones p.R378Q y p.R380Q, asociadas al síndrome de Du Pan Syndrome y a la Braquidactilia tipo A2 respectivamente que se ha mostrado que interfieren en el procesamiento del precursor proteico en la región de reconocimiento de las endoproteasas (Plöger *et al.*, 2008).

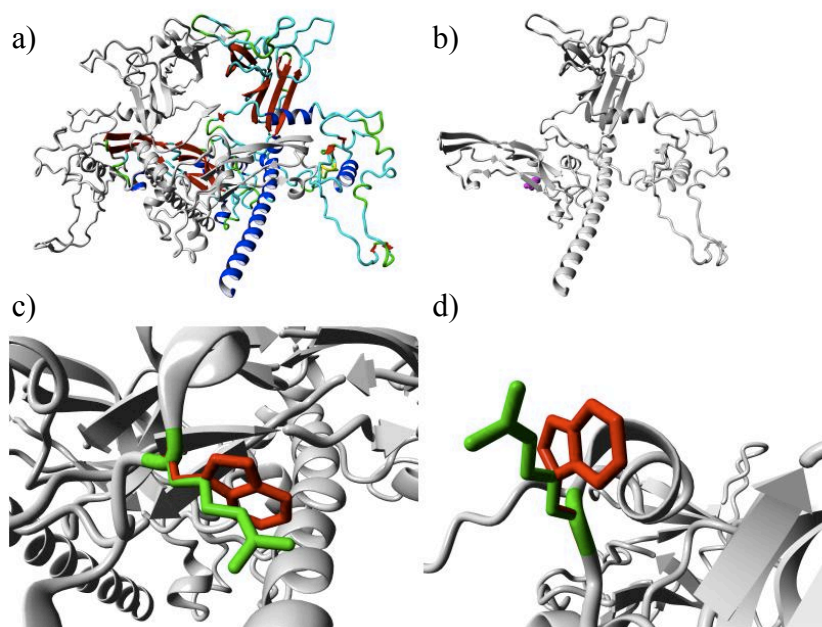


Figura 4.48. a);b) Estructura tridimensional de la proteína GDF-5 (P43026). c);d) Ubicación en dos ángulos del aminoácido wt (verde) que corresponde a la arginina vs el aminoácido Triptófano (en rojo) por el que cambia como consecuencia de una mutación en el codon 377 de la proteína GDF-5. Fichero PDB: 1BMP (proyecto Hope).

La consanguinidad de los padres del *probandus* (ver árbol ACH-247 en material y métodos), así como la referencia de otro caso similar en la familia, hijo también de primos hermanos, planteó la posibilidad del estudio del cambio p.Arg377Trp en la familia. Dicho estudio no se pudo realizar por la falta de colaboración de la familia. Además, dado que esta familia es de origen pakistaní, no se pudo realizar el estudio del cambio en población control, para determinar la presencia o ausencia del mismo, a fin de determinar la frecuencia alélica.

Este estudio se debe realizar en la población del origen étnico de la familia, puesto que un alelo puede tener frecuencias alélicas diferentes, según la etnia y población. Por ello se realizó una búsqueda de dicho cambio en el proyecto de 1000 genomas, no detectándose este cambio en ninguna población.

De las 4 mutaciones descritas en la base de datos HGMD, en el gen *CDMP-1*, asociadas a condrodisplasia tipo Grebe, la inserción en homocigosis de 4 pb (c. 1111_1114dupGAGT) fue identificada en una familia procedente también de Pakistan y consanguínea. Esta mutación genera un producto final de 371 aminoácidos al que le falta el dominio activo de la proteína por lo que la activación de la ruta de señalización en las células diana queda abolida (Basit *et al.*, 2008). De los pocos casos descritos con displasia acromesomélica tipo Grebe, esta familia y la referida en este estudio, ambas son procedentes de Pakistan y dado que parece ser que en esta región geográfica existe además tendencia a los enlaces consanguíneos, hay que tener en cuenta que pueden suceder más casos con displasia acromesomélica tipo Grebe en esta región geográfica.

Teniendo en cuenta el test predictivo de malignidad del cambio, el codon afectado situado en la región de reconocimiento de las endoproteasas, la conservación de dicho aminoácido a lo largo de la evolución, la consanguinidad de la familia, la referencia de otro caso de Pakistan con la misma patología y las publicaciones de otras mutaciones que afectan a codones cercanos al del paciente referido en este estudio, se postula que el cambio p.Arg377Trp es patogénico. Sin embargo, para confirmar esto, y comprender el mecanismo patogénico de este cambio sería necesario seguir profundizando en el estudio funcional de dicho cambio nucleotídico.

El diagnóstico genético prenatal en futuras gestaciones fue descartado por la familia por sus creencias culturales. El consejo genético ofrecido a dicha familia fue establecido teniendo en cuenta el contexto cultural de la misma. En este caso, uno de los puntos clave fue la importancia de la comprensión por parte de los progenitores del significado y la implicación de ser portador de una mutación en un entorno de consanguinidad y endogamia y el riesgo de recurrencia ante la sugerencia del padre de plantearse de unirse ante la posibilidad de un nuevo descendiente con anomalías fetales.

4.2.5 Síndrome de HOLT-ORAM

En total, 15 familias fueron remitidas con sospecha clínica de HOS. En primer lugar, se realizó el estudio de la región codificante del gen *TBX5* a los individuos afectados de dichas familias, mediante secuenciación de Sanger y se identificó la mutación responsable de su enfermedad en 3 familias (HOS-1, HOS-4 y HOS-14).

En estos tres casos existían antecedentes familiares que, siguiendo una herencia autosómica dominante, presentaban una patología similar.

-HOS-1: En la familia HOS-1 se identificó la mutación g.9641_9645dupG/p.Ala34Glyfs*27 en los individuos IV:2, IV:3 y V:4 . A pesar de presentar la misma mutación la manifestación clínica en los individuos afectados era diferente:

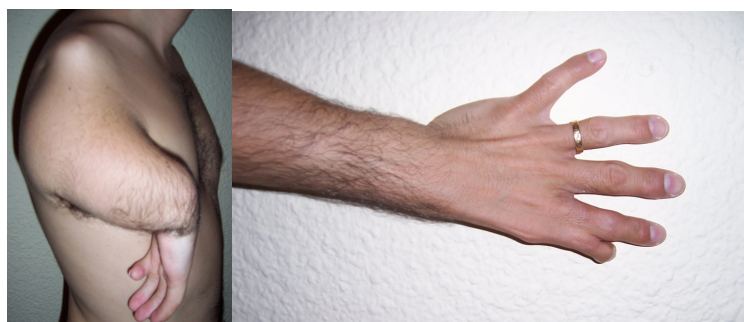


Figura 4.49. Mano izquierda y mano derecha del individuo IV:3 de la familia HOS-1.

- Individuo IV:3: Varón de 34 años de edad con hipoplasia 1^{er} dedo mano izquierda, limitación codo izquierdo, agenesia en miembro superior derecho y foramen oval en el corazón (figura 4.49.).

- Individuo V:4: varón de 4 años de edad con atrofia radial bilateral con ausencia del pulgar derecho, sindactilia del pulgar de la mano izquierda e insuficiencia cardíaca (figura 4.50.).



Figura 4.50. Manos del individuo IV:4 de la familia HOS-1.

La mutación p.Ala34Glyfs*27, descrita previamente como 100_101insG (Brassington *et al.*, 2003), fue renombrada considerando la secuencia de referencia empleada y siguiendo las nuevas normas establecidas por HGVS para la descripción de mutaciones. Esta mutación consiste en una inserción de una guanina en heterocigosis en el exón 2 del gen *TBX5* (figura 4.51. y 4.53.), que produce un codon de parada prematura unos 27 codones después de la inserción de una G en el codon 34. Debido a la proteína no funcional que se genera, ésta pierde el dominio de unión a DNA, también llamado dominio T-Box (comprende los aminoácidos del 55 al 237) y el dominio C-Terminal (comprende los aminoácidos del 238 al 518), por lo tanto, pierde su función como activador transcripcional, lo que conlleva a un fallo en la activación de la transcripción específica de genes del mesodermo (Brassington *et al.*, 2003).

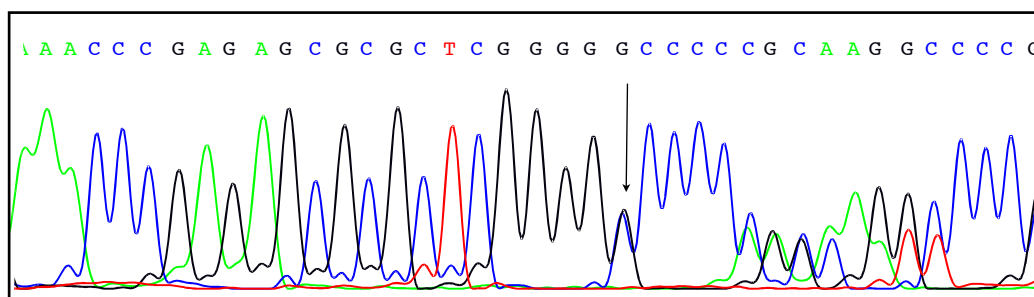


Figura 4.51. Electroferograma de la mutación p.Ala34Glyfs*27 generada por una inserción en heterocigosis de una guanina en el codon 34 de la proteína *TBX5* indicada con una flecha.

- **HOS-4:** las manifestaciones clínicas de esta familia fueron las siguientes:

- Individuo II:1 de HOS-4: *Probandus* de 37 años con prolapso de válvula mitral, insuficiencia moderada, acortamiento mesomérico de brazos, hipoplasia del 1^{er} dedo y sindactilia de 1^{er} y 2^o dedo de mano derecha.
- Individuo I:2 de HOS-4: Madre de *probandus* con comunicación interauricular y agenesia de antebrazos, sindactilia.

- **HOS-14:** en esta familia se disponían de los datos clínicos del *probandus*:

- Individuo II:2 de HOS-14: mujer de 24 años de edad que presenta comunicación interauricular intervenida y agenesia de miembros superiores.

Las familias HOS-4 y HOS-14, ambas no relacionadas entre sí, presentaron la misma mutación puntual (c.835C/T;p.Arg279*) en el exón 8 del gen *TBX5* (figura 4.52.-4.53). Esta mutación ha sido descrita en la literatura con anterioridad (Li *et al.*, 1997) y se ha sugerido que podría ser un punto caliente (Brassington *et al.*, 2003). Esta sustitución nucleotídica genera una proteína parcial con la mayoría de la región C-terminal ausente, conservándose prácticamente sólo el dominio de unión a ADN a la secuencia consenso TCACACCT de sus genes diana (Conlon *et al.*, 2001). La delección de la región terminal a partir del codon 242 conllevaría una inhibición de la unión al dominio T-Box (Ghosh *et al.*, 2001).

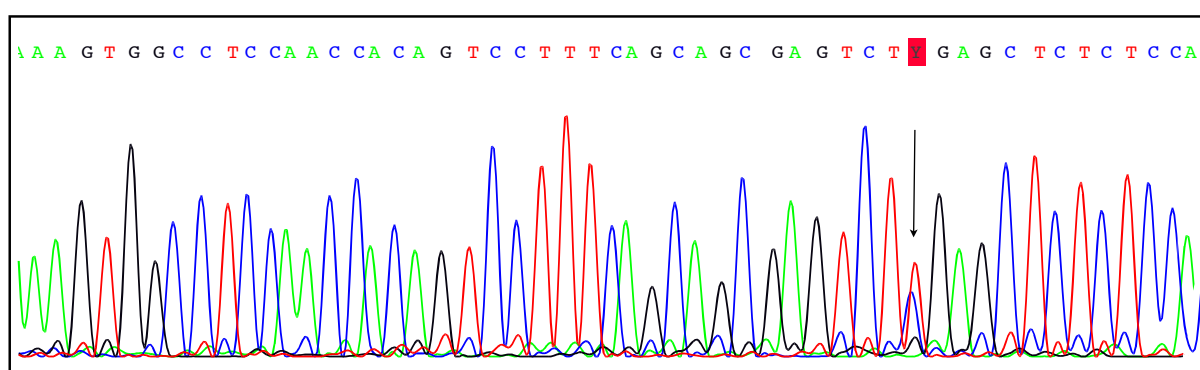


Figura 4.52. Electroferograma de la mutación p.Arg279* en el exón 8 del gen *TBX5*, generada por una sustitución en heterocigosis, de una citosina por una timina en la posición 835 del cDNA, indicada con una flecha.

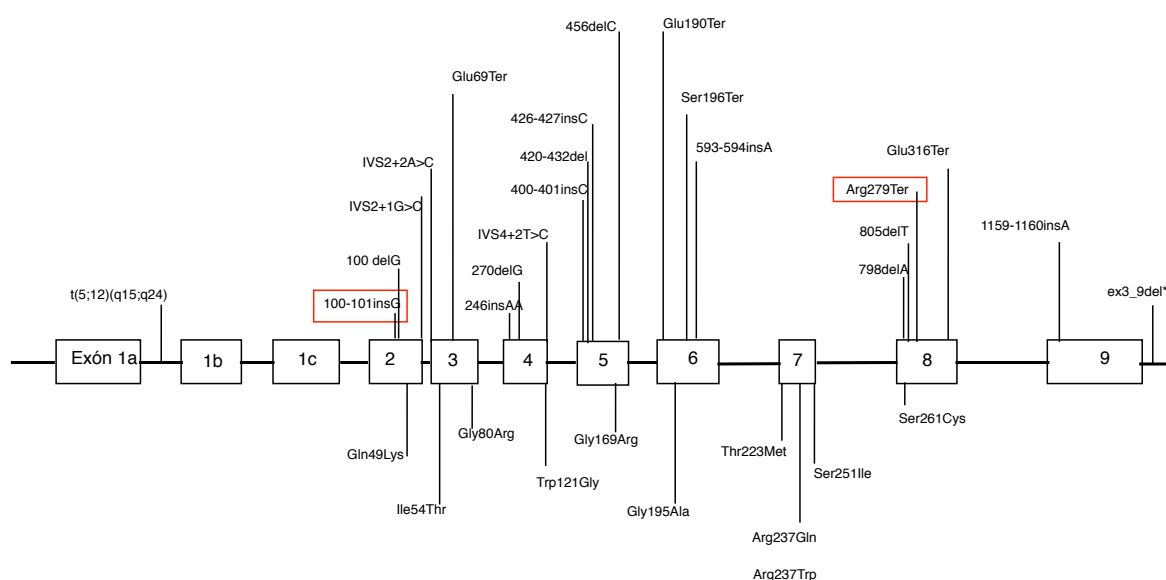


Figura 4.53. Estructura del gen *TBX5*, en el que se indican la mayoría de las mutaciones descritas. Enmarcadas en recuadros rojos se representan las mutaciones identificadas en este estudio.

Ambas mutaciones, p.Ala34Glyfs*27 y p.Arg279*, implicarían una disminución de la dosis génica del gen *TBX5* generando la haploinsuficiencia de la proteína y por tanto, la posterior no activación de los genes diana como es el gen *NPPA* que codifica el factor natriurético atrial (Bruneau *et al.*, 2001). Hatcher y Basson en 2001 propusieron que la mayoría de las mutaciones de cambio del marco de lectura y las sustituciones por codones de parada, conllevarían a que los mRNA de *TBX5* mutados sean degradados, resultando en haploinsuficiencia del producto génico e impidiendo su localización nuclear correspondiente y que aquellas mutaciones que consisten en un cambio de aminoácido, producirían transcritos con la actividad de unión a ADN disminuida (Hatcher & Basson, 2001). Estos dos tipos de mutaciones igualmente producirían una disminución de la dosis génica, provocando la manifestación clínica del síndrome de Holt-Oram (Hatcher & Basson, 2001).

La caracterización genética de las familias permite proporcionar un consejo genético más apropiado, y ofrecer el diagnóstico genético prenatal convencional o eventualmente, el diagnóstico genético preimplantacional y en el caso donde la mutación sea de herencia paterna, el diagnóstico genético prenatal no invasivo, mediante el estudio molecular del ADN fetal libre en plasma materno.

Este fue el caso de la familia **HOS-1**, donde la pareja compuesta por los individuos IV:3 y IV:4, tras conocer los resultados genéticos, acudió a consulta para conocer las opciones reproductivas para una tercera gestación. La pareja optó finalmente por el embarazo espontáneo y posterior diagnóstico genético prenatal. A las 12 semanas de gestación se realizó la biopsia corial, se extrajo ADN de la muestra obtenida (10/0027) y se llevó a cabo la secuenciación del exón 2 del gen *TBX5*, a fin de detectar la presencia o ausencia de la mutación familiar. Simultáneamente, se realizó la técnica de QF-PCR para confirmar la procedencia fetal de la misma, descartando la posible contaminación materna de la muestra. El resultado de la secuenciación reveló que la muestra 10/0027, presentaba la mutación paterna p.Ala34Glyfs*27 en heterocigosis. Adicionalmente, mediante QF-PCR se determinó el patrón femenino de la muestra, la procedencia fetal de la misma y se descartó la presencia de alguna de las aneuploidías más frecuentes que se asocian a fetos con malformaciones congénitas.

Tras conocer que el feto presentaba la mutación paterna, la gestante decidió continuar la gestación. La detección temprana de esta mutación pudo permitir realizar un seguimiento idóneo del feto y establecer recomendaciones adecuadas de actuación ante esta patología.

A priori, el diagnóstico prenatal no invasivo parecía factible en esta pareja, debido a que la mutación causante de la enfermedad era de procedencia paterna. Sin embargo, debido a la localización de la inserción nucleotídica, no se pudo realizar ningún diseño de sonda compatible, puesto que en los linfocitos de origen materno se observaba, en menor medida, una hibridación inespecífica que generaba una señal coincidente con el alelo patológico, por lo que esta estrategia fue descartada por este artefacto y por las concentraciones críticas del ADN fetal presente en el plasma materno.

Adicionalmente, se realizó la cosegregación de la mutación mediante microsatélites cercanos al gen *TBX5*, donde se detectó que el haplotipo: 192-245-210-188, lo compartían los individuos afectados de la familia, siendo este conjunto de alelos, el que se heredaban junto con la mutación (*figura 4.54*).

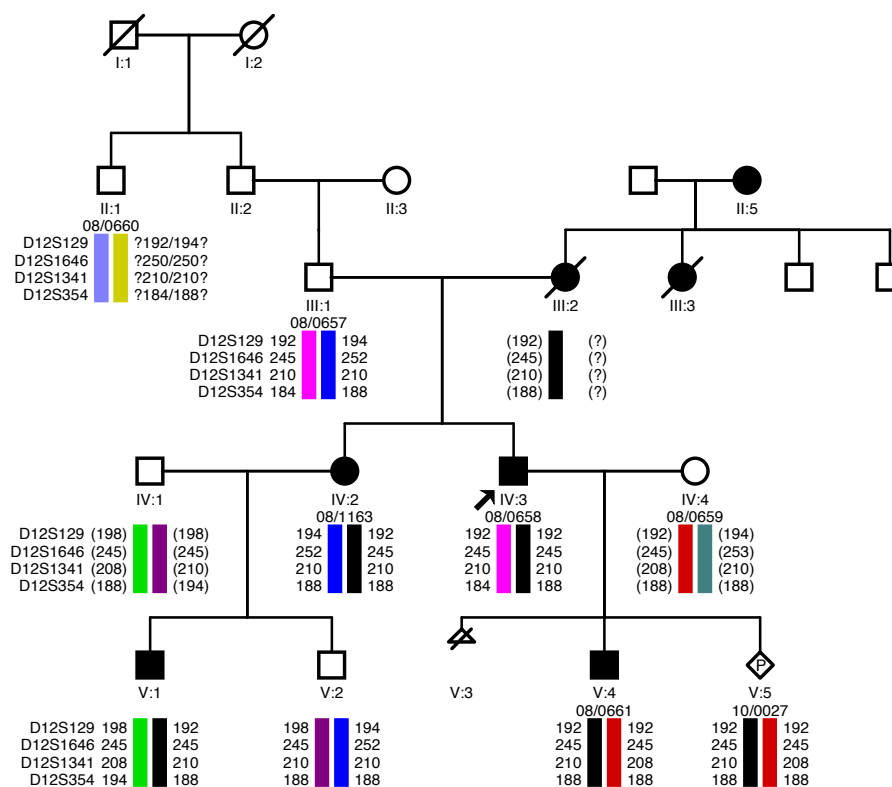


Figura 4.54. Análisis de haplotipos de los miembros de la familia HOS-1. Se representa en negro el haplotipo que se hereda junto con la mutación.

El estudio de informatividad en esta familia no permitiría el abordaje del diagnóstico genético preimplantacional mediante esta estrategia, ya que los 4 microsatélites empleados no fueron informativos para la pareja IV: 3 y IV:4. El microsatélite D12S354 podría considerarse semi-informativo y debido al fenómeno ADO, previamente comentado (*ver pág. 205*), se correría el riesgo de no ser apto para transferencia de un embrión sano con un ADO, por falta de certeza diagnóstica. Por lo tanto, un único microsatélite y semi-informativo no es suficiente para realizar un estudio idóneo de DGP. Esto mismo sucedió en el caso de la pareja IV:1 y IV:2, donde todos los marcadores empleados en el análisis de haplotipos eran no informativos, salvo el D12S129 que fue considerado como marcador semi-informativo en esta caso. Por lo que esta opción reproductiva tampoco estaría disponible para esta pareja, empleando estos mismos marcadores. El empleo de otros marcadores adicionales a los considerados en este estudio no pudo llevarse a cabo, puesto que o bien no eran polimórficos o bien la distancia de dichos microsatélites con el gen superaban la unidad mínima de recombinación, no garantizando su herencia junto con la de la mutación.

De las 15 familias analizadas, en 12 no se detectaron mutaciones puntuales en la región codificante del gen. La tasa de detección de mutaciones puntuales en el gen *TBX5* mediante secuenciación Sanger en el presente estudio fue del 20% (3/15). Según Mc Dermott y colaboradores, más del 70% de individuos que manifiestan exclusivamente, deformidad del eje radial preaxial, defectos en la conducción cardíaca y defectos en el septo cardíaco atrial y/o ventricular, presentan mutaciones en la región codificante del gen *TBX5* y que tasas inferiores de detección (30%-40%) pueden ser debidas a la inclusión de individuos que no se ajusten estos estrictos criterios clínicos (Brassington *et al.*, 2003; Cross *et al.*, 2000).

En la revisión de las historias clínicas se pudo confirmar que en la mayoría de los casos negativos para la secuenciación del gen *TBX5*, los pacientes afectados manifestaban otras características clínicas que no encajaban en dichos criterios estrictos (*tabla 4.6*). A excepción de la familia HOS-13, que aún cumpliendo los criterios clínicos estrictos no fue identificada la mutación. Sin embargo, no se descarta que existan mutaciones en las regiones reguladoras del gen, ni en genes reguladores como *GATA4* y *NKX2.5*, ni para esta familia ni para el resto de las familias en las que no fue identificada la mutación. En 2010, se detectaron mutaciones en el gen *GATA4* en un individuo con malformación aislada de miembros superiores y en el gen *NKX2.5* con malformación cardíaca aislada (Porto *et al.*, 2010).

Familias	Casos índice	Criterios Clínicos Estrictos			Criterios no estrictos	Mutación en gen <i>TBX5</i>	MLPA Salsas p179 y p180	Array CGH (Agilent 440K)
		Deformidad del eje preaxial radial (asimetría bilateral)	Defectos en conducción cardíaca	Antecedentes personal y/o familiar en defectos de septación cardíaca				
HOS 1	08/0658	✓	✓	✓	?	p-Ala34Glyfs*27 <i>Brassington (2003) Am J Hum Genet 73, 74</i>	N/A	N/D
HOS 2	08/1716	?	?	?	Hipoplasia de 4º y 5º dedo. Ausencia de pectoral izquierdo	—	Deleción del gen <i>GLI3</i>	Ver tabla 4.7.
HOS 3	09/0514	?	?	✓	Agnesia de 4º y 5º dedo. Camptodactilia del 3º dedo.	—	—	N/D
HOS 4	09/0515	✓	✓	✓	?	p-Arg279* <i>Li (1997) Nat Genet 15, 21</i>	N/A	N/D
HOS 5	09/1516	✓	?	✓	?	—	—	N/D
HOS 6	09/0725	✓	X	X	Hipoplasia de 1ª costilla izquierda. Agnesia dentaria	—	Deleción del gen <i>GLI3</i>	Ver tabla 4.7.
HOS 7	09/0827	✓	X	✓	Cefalosciosis dorsal Dilatación pelvis renal Criptorquidia	—	—	Ver tabla 4.7.
HOS 8	09/1711	✓	?	?	Hipoplasia de cúbito izquierdo	—	—	N/D
HOS 9	10/2012	✓	X	?	Hipoplasia bilateral de cúbito.	—	—	N/D
HOS 10	10/2116	✓	✓	X	Hipoacusia bilateral de origen endococlear. Hipoplasia cubital.	—	—	N/D
HOS 11	11/1148	✓	✓	X	X	—	—	N/D
HOS 12	11/1149	✓	✓	?	X	—	—	N/D
HOS 13	11/1186	✓	✓	✓	X	—	—	N/D
HOS 14	11/2054	✓	✓	✓	X	p-Arg279* <i>Li (1997) Nat Genet 15, 21</i>	N/A	N/D
HOS 15	12/0338	✓	?	✓	X	Deleción del exón 9 <i>En este estudio</i>	Deleción del exón 9	N/D

Tabla 4.6. Criterios clínicos de los probanda afectos de síndrome de Holt-Oram en las familias analizadas en este estudio, las mutaciones identificadas en el gen *TBX5* y los resultados de MLPA empleado (kit p179 y p180). Asimismo se indican los casos estudiados mediante CGH. El signo tic señala la presencia del signo clínico, la cruz su ausencia y la interrogación indica que se desconoce si está presente o ausente. N/A: No aplica; N/D: No disponible.

Dado que la tasa de detección de delección de un único exón o incluso de la delección completa del gen se encuentra entorno al 2% en individuos afectados de Holt-Oram sin mutación detectada mediante secuenciación Sanger, se analizaron mediante MLPA (salsas p179 y p180) aquellas familias que no habían sido caracterizadas mediante secuenciación Sanger (Borozdin *et al.*, 2006), a fin de descartar delecciones o duplicaciones tanto en el gen *TBX5* como en otros genes implicados en malformación de miembros o en genes cuyas mutaciones producen manifestaciones clínicas solapantes con el síndrome de Holt-Oram como el síndrome de Okihira o el síndrome de Townes Brocks (Jones, 2006).

- En la familia **HOS-15**, la pareja formada por los individuos III:1 y III:2 presentaban recurrencia de amelia bilateral de miembros superiores en dos gestaciones sucesivas. El individuo III:1 presentaba ligero acortamiento de los miembros superiores y refería CIA, al igual que su madre (individuo II:2). Además de las muestras de estos dos individuos, fue remitida la muestra de un feto (cuarta gestación de la pareja) con amelia bilateral superior.

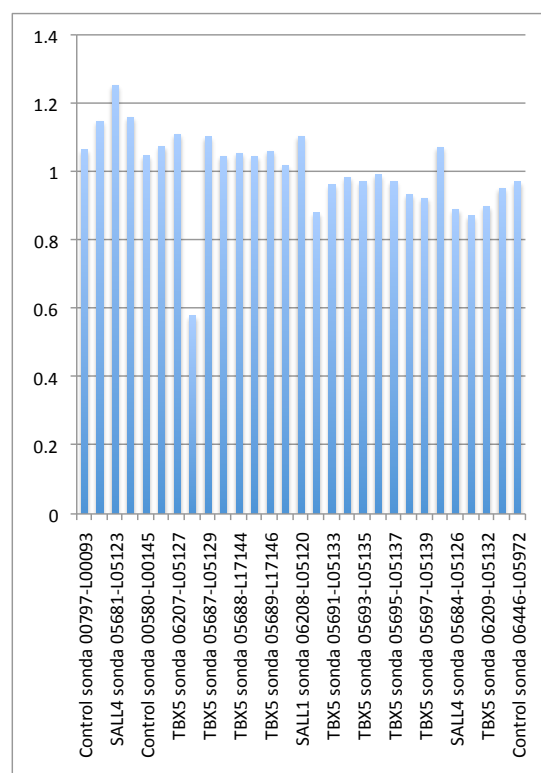


Figura 4.55. Normalización de las áreas de amplificación de las sondas de MLPA del kit p180. Se observa una disminución de al menos un 35-50% de la sonda correspondiente al exón 9 del gen *TBX5*.

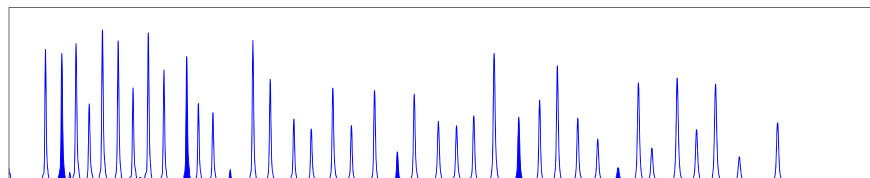
En primer lugar, se estudió la región codificante del gen *TBX5*, mediante secuenciación Sanger, a partir de la muestra fetal. Tras el resultado negativo, se realizó el análisis de MLPA empleando los kit p179 y p180. Se detectó una delección de la sonda 06207-L05127 en heterocigosis. Esta sonda hibrida en el exón 9 del gen *TBX5* (*figura 4.55.) (tabla 4.6.)*, que corresponde al fragmento 9a de este estudio.

Se secuenció el fragmento 9a para descartar posibles SNPs que pudieran afectar a la estabilidad de la unión de la sonda al ADN genómico y conllevar un resultado falso. No se detectó ningún cambio en dicha secuencia por lo que apoya la teoría de delección.

Sin embargo, mediante esta metodología no se puede acotar el tamaño de la delección por lo que en un principio sería necesario emplear otras técnicas moleculares adicionales, para delimitar el tamaño de la delección como por ejemplo microarrays CGH. Dada la ubicación de la sonda, se perdería al menos parte de la región C-terminal de la proteína, lo que conllevaría una inhibición de la unión al dominio T-Box (al igual que la mutación p.Arg279*).

- En las familias **HOS-2**, **HOS-6** y **HOS-7** se detectó, *a priori*, una disminución de aproximadamente 35-70% de algunas de las sondas correspondientes a la región codificante del gen *GLI3* (*figura 4.56*). *Este gen es responsable del síndrome de Greig Cefalopolisindactilia (OMIM: 175700), que cursa con alteraciones en las extremidades, fundamentalmente polidactilia y sindactilia, y alteraciones craneofaciales, no siendo frecuente la afectación cardíaca.*

ADN: 08/1716 (**HOS-2**)



Muestra control

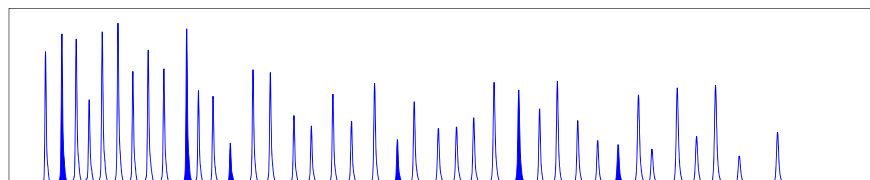


Figura 4.56. Resultado del kit p179 de MLPA a partir de la muestra del caso índice de la familia HOS-2. Los amplicones sombreados corresponden a las sondas que hibridan en los exones codificantes del gen *GLI3*.

A fin de confirmar los resultados observados en las familias HOS-2 HOS-6 y HOS-7, se analizaron mediante Arrays CGH las muestras de ADN procedentes de los individuos afectados de dichas familias. Los resultados obtenidos mediante Array CGH, no apoyaron la delección del gen *GLI3* para ninguno de los casos (*tabla 4.7*). Esto puede deberse a un artefacto de la técnica de MLPA, ya que la mala calidad del ADN de partida puede enmascarar o falsear los resultados obtenidos mediante esta técnica. Además, algunas de las sondas de MLPA hibridan en regiones con CNVs descritas, e incluso en regiones donde hay descritos SNPs que puede afectar a la estabilidad de la unión de la sonda, por lo que valorar el efecto de dosis en dichas regiones es complejo.

CASOS	ALTERACIÓN CROMOSÓMICA IDENTIFICADA POR ARRAY	GENES INCLUIDOS Y SU FUNCIÓN PROTEICA	CASOS DESCRIPTOS
08/1716 (HOS-2)	arr 12q24.21 (113,303,379-113,306,712)x3.	Gen: <i>TBX5</i> (región intrónica) Función: Interviene en el desarrollo cardíaco y de miembros	Mutaciones en este gen se ha asociado con el síndrome de Holt-Oram
	arr 14q23.1 (60,090,679-60,137,860)x1.	No hay genes ni otros elementos funcionales en esta región	N/A
	arr 20q13.13 (47,585,863-47,612,359)x1.	Gen: <i>PTGIS</i> Función: prostaciclina sintetasa que se encuentra predominantemente en el endotelio vascular y en las células del músculo liso	Diversas mutaciones y polimorfismos en este gen se han reportado asociados a hipertensión esencial, infarto de miocardio e infarto cerebral
09/0725 (HOS-6)	arr 1p36.13 (17,347,664-17,429,377)x3	Gen: <i>PADI1</i> Función: enzima que participa en las últimas etapas de la diferenciación epidérmica y se cree que también podría estar implicado en la formación del folículo piloso.	No se conoce hasta ahora implicación en patología
	arr 2q23.1 (148,651,057-148,672,331)x1	No hay genes ni otros elementos funcionales en esta región	N/A
	arr 1p32.2 (58,514,497-58,642,296)x3	No hay genes ni otros elementos funcionales en esta región	N/A
09/0827 (HOS-7)	arr 4p14 (37,671,214-37,687,833)x1.	Gen: <i>TBC1D1</i> Función: proteína que participa en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular	Se han descrito polimorfismos en este gen asociados con Obesidad
	arr 6q27 (165,137,901-165,172,168)x1	No hay genes ni otros elementos funcionales en esta región	N/A
	arr Xp22.33/Yp11.32p11.31 (1,677,440-1,712,436)x3.	2 genes: 1- Gen: <i>XE7</i> Función: factor de <i>Splicing</i> 2- Gen: <i>ASMT</i> Función: acetilserotonin metiltransferasa, la cual cataliza la reacción final de síntesis de la melatonina y es abundante en la glándula pineal y en la retina	Duplicaciones parciales del gen <i>ASMT</i> se han identificado recientemente en población general y se han asociado a fenotipos autistas

Tabla 4.7. Alteraciones cromosómicas identificadas por array CGH en los casos seleccionados que fueron referidos con sospecha clínica de Holt-Oram que no presentaban mutación en el gen *TBX5* ni duplicaciones o deleciones en genes relacionados con malformación de miembros. Se indican asimismo los genes incluidos en dichas alteraciones, así como los casos descritos en la literatura con alteraciones en los genes incluidos en las alteraciones cromosómicas.

Mediante Arrays CGH se detectaron CNVs no descritas en los individuos: II:1 de la familia HOS-2, III:8 de la familia HOS-6 y III:10 de la familia HOS-7 (*tabla 4.7.*). Hasta la fecha, no se han descrito asociación entre dichas CNVs y el síndrome de Holt-Oram. Sin embargo, cabe destacar la duplicación de la región intrónica del gen *TBX5* (intrón 7), detectada en el individuo HOS-2, ya que puede existir una región reguladora en dicha zona que podría ocasionar la sintomatología en el paciente. Sin embargo, sería necesario en primer lugar estudiar a los familiares y en segundo lugar, realizar un estudio más exhaustivo de dicha alteración para poder establecer la asociación entre esta CNV y la patología. Por tanto, las alteraciones en zonas no codificantes o zonas reguladoras del gen podrían ser la explicación del fenotipo, para aquellos casos que no cumplen los criterios clínicos estrictos.

No obstante, es frecuente que, ante la llegada de un paciente con malformación de miembros, defectos en el septo atrial y/o en la conducción cardiaca, conlleven a diagnosticar al paciente como síndrome de Holt-Oram. Sin embargo, estos aspectos solapan con otros síndromes. De hecho, en aquellos individuos, que no siguen el criterio estricto para el diagnóstico de síndrome de Holt-Oram y en donde no se han identificado mutaciones en el gen *TBX5*, en muchas ocasiones, presentan características clínicas notables, no propias de esta patología, como la malformación de miembros inferiores, anomalías renales, malformaciones craneofaciales, sindactilia diferentes al pulgar o polidactilia. Asimismo, hay que tener en cuenta, la bilateralidad de las manifestaciones clínicas en cuanto a la malformación de los miembros de la enfermedad, ya que la unilateralidad, debe ser otro indicativo clínico en contra del diagnóstico hacia el síndrome de Holt-Oram.

Estas manifestaciones, en lugar de considerarse como parte de la heterogeneidad clínica del síndrome de Holt-Oram, deben desplazar el diagnóstico inicial de esta patología, hacia otras con clínica solapante, como son las patologías Okhiro, VACTERL, etc (McDermott *et al.*, 2005). Incluso en los casos donde manifiesten fenotipos que quiebren la simetría bilateral en la embriogénesis, habría que considerar el estudio de genes implicados en la distribución del eje embrionario izquierda-derecha o aquellos genes involucrados en la organogénesis cardíaca en cuya formación, pueda existir dosis diferencial en la expresión de dichos genes en este mismo eje (Icardo, *et al.*, 2002) o genes cuyas mutaciones generen malformación de miembros como *GLI3*, *SHH*, *SALL4*, y *HOXD13*, estrategia apoyada por Funiss y colaboradores, en 2009.

Tras la experiencia adquirida en este estudio, se propone el siguiente diagrama de flujo (*figura 4.57.*), para dirigir el estudio molecular en función de si los pacientes cumplen criterios clínicos estrictos, o por el contrario, manifiestan clínica similar a otras patologías.

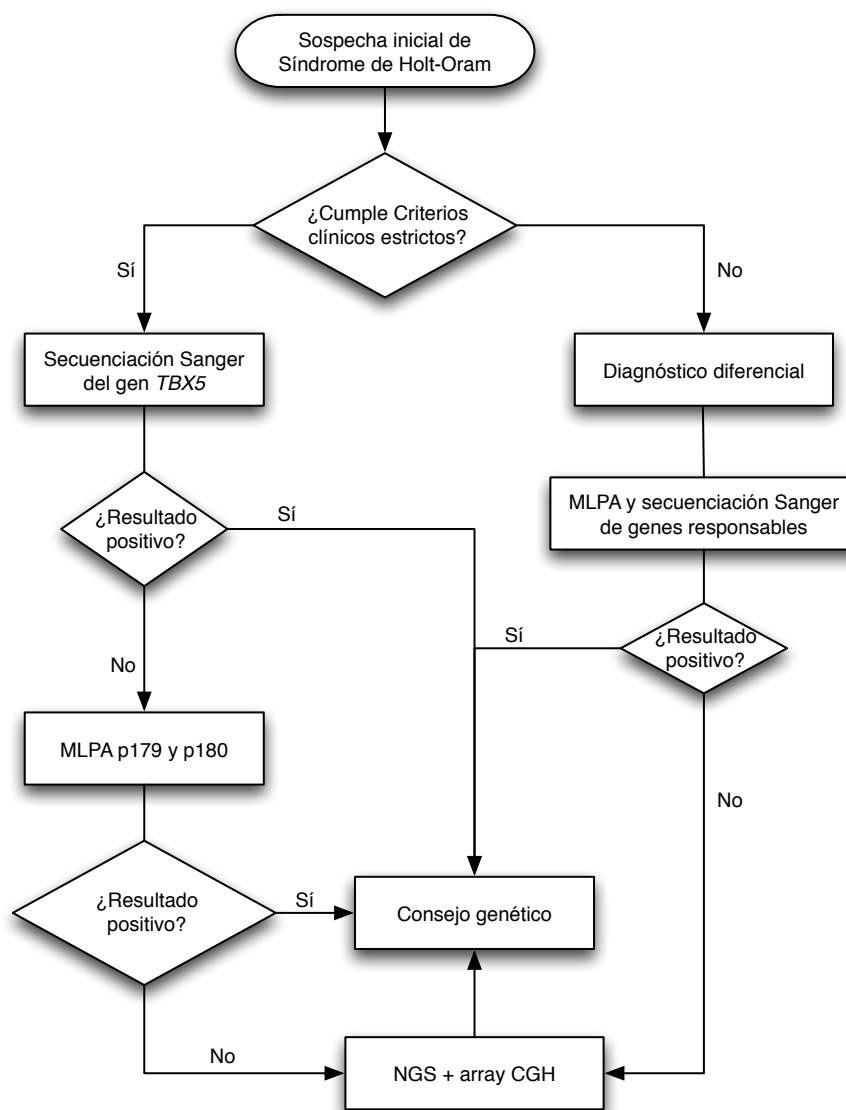


Figura 4.57. Diagrama de flujo para el estudio molecular de individuos referidos con la sospecha clínica inicial de síndrome de Holt-Oram.

De esta manera se recomienda que si el paciente no cumple criterios clínicos estrictos, antes del estudio molecular del gen *TBX5*, se debería realizar un estudio exhaustivo de los rasgos clínicos, a fin de descartar otros síndromes y en el caso de que tras realizarlo aún se mantenga la sospecha clínica, entonces se procedería al estudio del gen *TBX5*, siguiendo el mismo protocolo de actuación que en el caso de cumplir criterios clínicos estrictos.

A la dificultad del diagnóstico, por la expresividad variable propia de la enfermedad (Brassington *et al.*, 2003) y por la características solapantes que presenta con otras enfermedades, se le añade la baja frecuencia de esta enfermedad. El síndrome de Holt-Oram, como muchos de los defectos congénitos de baja prevalencia presenta un amplio espectro de manifestación fenotípica. Por lo tanto, la correlación genotipo-fenotipo de esta patológica supone una fuente de información sobre los mecanismos moleculares y del desarrollo subyacentes al desarrollo normal cardíaco, a la formación de las extremidades y permite ofrecer un adecuado manejo clínico de pacientes con HOS. Sin embargo, el número de pacientes afectados de HOS de familias no relacionadas limita establecer esta correlación, no sólo por el tamaño muestral debido a que corresponde a una enfermedad rara, sino además, porque dichas familias presentan diferentes mutaciones.

Hasta la fecha, no se han encontrado evidencias de que el tipo de mutación o bien la localización de la misma en el gen *TBX5* predigan la severidad de las alteraciones cardíacas o de los miembros en individuos afectados con el síndrome de Holt-Oram (Brassington *et al.*, 2003). Diversos estudios se han llevado a cabo, para intentar comprender los mecanismos patogénicos moleculares y el significado funcional de las mutaciones identificadas en el gen *TBX5*; pero hasta el momento estos aspectos permanecen sin dilucidar. Su aclaración sería crucial para descubrir los entresijos de esta enfermedad.

Considerando las limitaciones en cuanto al diagnóstico clínico del HOS, un examen físico riguroso del paciente es crucial para la identificación de signos que ayuden a descartar o determinar la sospecha clínica inicial de HOS a fin de realizar un estudio genético más apropiado analizando o bien el gen *TBX5* u otros genes involucrados en otras patologías que produzcan fenotipos parecidos. Además, la posibilidad de confirmar el diagnóstico clínico mediante el análisis genético es importante para el manejo clínico de los pacientes afectados por el síndrome, así como de sus familiares, porque permite identificar a individuos de la familia que estén en riesgo de desarrollar la enfermedad. Por tanto, tal y como propone Brassington y colaboradores en 2003, el estudio de esta patología requiere un acercamiento multidisciplinar, en el que deben intervenir especialistas en genética biomédica, cardiología, radiólogos, etc, que permita el manejo clínico de los pacientes afectados de dicha patología.

4.2.6 ALBINISMO

El diagnóstico clínico de albinismo está basado en los hallazgos clínicos oftalmológicos, pediátricos, dermatólogos etc. Este diagnóstico en ocasiones resulta complejo debido a la heterogeneidad clínica del mismo, sobre todo entre los diferentes tipos de albinismo oculocutáneo aislado y debido a la evolución de la pigmentación con la edad, en aquellos pacientes con actividad enzimática residual. En general, en regiones geográficas donde la población es muy pigmentada, la diferenciación de una persona con albinismo es menos compleja que en aquellas regiones donde la población es poca pigmentada, donde pueden ser erróneamente diagnosticadas de albinismo ocular u otra anomalía ocular. Las diferencias fisiológicas de color de piel, ojos y pelo en las diferentes etnias no depende de el número de melanocitos (Tadokoro *et al.*, 2005) sino por el número, localización, forma, tamaño y contenido de los melanosomas, y por tanto, por la transferencia de melanina a los melanocitos, así como la fracción entre eumelanina y feomelanina (Rees, 2003).

En España gran porcentaje de la población es pigmentada, no obstante hay una enorme variabilidad social y dado que este estudio abarca pacientes de diversas poblaciones y con diverso grado de pigmentación, algunos casos con sospecha clínica de albinismo ocular fueron revaluados para el diagnóstico oculocutáneo. Por ello, el diagnóstico molecular es necesario para determinar el tipo de albinismo. El estudio de la etiopatogenia de dicha condición genética permite la mejor comprensión de los mecanismos que subyacen a la misma, así como ofrecer un adecuado consejo genético a los pacientes que presentan albinismo.

En este estudio se analizaron 11 familias con Albinismo Oculocutáneo aislado y 13 familias con Albinismo Ocular tipo 1.

4.2.6.1 ALBINISMO OCULOCUTÁNEO AISLADO

Las dos formas de albinismo oculocutáneo aislado más frecuentes en población caucásica son la forma OCA1 y OCA2 (Hutton & Spritz, 2008). La prevalencia varía en las diferentes regiones geográficas, debido a la consanguinidad de algunos grupos étnicos, a las mutaciones surgidas de un efecto fundador y a la dificultad de diferenciar los diferentes subtipos de albinismo con respecto al patrón normal de pigmentación (Grønskov *et al.*, 2007).

Se recogieron los datos oftalmológicos y los antecedentes familiares así como el color de ojos, piel, pestañas y cuero cabelludo de los 11 pacientes con albinismo oculocutáneo aislado pertenecientes a familias no relacionadas entre sí, que participaron en este estudio, a fin de establecer una posterior correlación genotipo-fenotipo.

Según los datos clínicos, *a priori* se pudieron distinguir al menos tres fenotipos en las diferentes familias estudiadas (*tabla 4.8.*):

- Fenotipo OCA1A: OCALB-4, OCALB-5, OCALB-6, OCALB-7, OCALB-9, OCALB-10.
- Fenotipo OCA1B: OCALB-3, OCALB-8, OCALB-11.
- Fenotipo OCA2: OCALB-1, OCALB-2.

Sin embargo, debido a la subjetividad de la evaluación del color de pelo obtenido de los informes, a la falta de datos clínicos dermatológicos detallados o la ausencia de seguimiento en la progresión del pigmento en los pacientes, así como la falta de análisis bioquímico de la actividad tirosinasa a partir del bulbo piloso, y a la dificultad de realizar un diagnóstico diferencial del fenotipo entre los diferentes tipos de albinismo, se realizó el estudio de los genes más frecuentemente mutados en la etnia de procedencia de la familia.

FAMILIA	PACIENTE	COLOR CUERO CABELLUDO	COLOR PELO CORPORAL	COLOR CEJAS	COLOR OJOS	COLOR PIEL	DATOS OFTALMOLÓGICOS	ANTECEDENTES FAMILIARES
OCALB-1	09/0031	AMARILLO	CLARO	CLARAS	AZULES	PÁLIDA	Nistagmo congénito. Transiluminación iridiana, cristalinus transparentes. Fondo de ojo: Transparencia de vasos coroides. Papilas pálidas	Antecedentes familiares albinos
OCALB-2	09/0303	AMARILLO-ANARANJADO	CLARO	CLARAS	AZULES	PÁLIDA	Nistagmo. Cataratas. Fondo de ojo: hipopigmentación difusa. Hipoplasia foveal. Biomicroscopia transparencia retiniana, transiluminación iridiana.	Único caso en la familia
OCALB-3	09/1353	BLANCO-AMARILLENTO	BLANCO	BLANCAS	AZULES	PÁLIDA	N/D	Hermano con albinismo oculocutáneo
OCALB-4	09/1537	BLANCO	BLANCO	BLANCAS	AZULES	PÁLIDA	Nistagmo congénito. Fondo de ojo: papilas hipoplásicas, foveolas no definidas, transparencia retiniana	Padre, madre y abuelos paternos con pelo rubio, ojos azules y piel pálida
OCALB-5	09/1738	BLANCO	BLANCO	BLANCAS	AZULES	PÁLIDA	Nistagmo congénito, Fotofobia intensa, Baja agudeza visual (4 meses). Foveolas no definidas, papilas hipoplásicas. Transparencia retiniana, Iris translúcido, Discreto estrabismo convergente	Pelo rubio y ojos azules
OCALB-6	10/1526	BLANCO-CREMOSO	BLANCO-CREMOSO	BLANCAS (CREMOSO)	AZULES-GRISÁCEOS	MUY BLANCA	Nistagmo congénito. Fotofobia, disminución de la agudeza visual, no existe estructuración macular. Iris translúcido, papilas hipoplásicas. Astigmatismo	Pelo rubio y ojos claros (No albinos)
OCALB-7	10/2149	BLANCO	BLANCO	BLANCAS	AZULES	PÁLIDA	Nistagmo congénito horizontal. Fotofobia. Agudeza visual: 0.1-0.1. Fondo de ojo: hipopigmentación difusa retiniana. Transparencia de vasos coroides. Reflejo foveolar ausente.	Familiar con mismo fenotipo pero el color del cuero cabelludo es oscuro
OCALB-8	11/0796	RUBIO	RUBIO	RUBIAS	CASTAÑO	PÁLIDA	N/D	Tío-abuelo paterno con nistagmo. Pelo y ojos oscuros.
OCALB-9	11/2301	BLANCO	BLANCO	BLANCAS	AZULES	CLARA	Fondo de ojo hipopigmentación difusa corioidea-retiniana Agudeza visual: no colabora. Biomicroscopia: Transiluminación positiva iridiana.	Padre con pelo rubio y ojos claros. Tío con sospecha de albinismo oculocutáneo
OCALB-10	10/1023	BLANCO	BLANCO	BLANCAS	AZULES	PÁLIDA	Nistagmo horizontal y problemas escolares de adaptación a las tareas escolares por sus problemas oftalmológicos Fondo de Ojo: Blanco lechoso (apigmentado-hipopigmentado). Hipopigmentación retiniana periférica. Agudeza vascular: 0.3-0.5.	Padre Biológico con pelo blanco, cejas blancas y anomalías oculares
OCALB-11	10/0155	CREMA-AMARILLENTO	CREMA-AMARILLENTO	CREMA-AMARILLENTO	CLAROS	ROSÁCEA	Nistagmo horizontal y baja visión nocturna Fondo de Ojo: Despigmentado por fuera de las arcadas. Hipopigmentación retiniana periférica. Baja agudeza visual	Tía materna con albinismo

Tabla 4.8. Datos clínicos de las familias con indicación de albinismo oculocutáneo aislado. Se detallan el color de pelo de cejas, pestañas, corporal y cuero cabelludo, así como, el color de la piel; los datos oftalmológicos y los antecedentes familiares en cada caso.

En los pacientes caucásicos europeos, se llevó a cabo en primer lugar, el análisis molecular mediante secuenciación Sanger de la región codificante del gen *TYR*. De los 11 pacientes, en 8 se identificó al menos una mutación en el gen *TYR* (*tabla 4.9.*).

- En un total de 5 familias (**OALB-3, OALB-5, OALB-6 OALB-9 y OALB-11**) se identificaron 2 mutaciones. Todas ellas fueron descritas con anterioridad en la literatura a excepción de la mutación p.P128Qfs*12. En las cuatro últimas familias, las mutaciones identificadas se encontraron en heterocigosis compuesta, tal y como se ha descrito anteriormente para este gen y para otros genes asociados con albinismo oculocutáneo aislado (Spritz, 1994) y como cabría esperar en ausencia de endogamia o consanguinidad. En el paciente OALB-3 se detectó la mutación p.P81L en homocigosis en una familia donde sí existía consanguinidad.
- En 3 pacientes (**OALB-2; OALB-4 y OALB-8**) se identificó una única mutación. Las mutaciones p.Ser145Pro y p.Met252Arg, no estaban identificadas con anterioridad.
- En dos familias (**OALB-7 y OALB-10**) con sospecha de OCA1, no se encontraron mutaciones en el gen *TYR*.

Estos datos concuerdan con lo reportado en población caucásica, donde mayoritariamente en los pacientes con OCA1 se encuentran las dos mutaciones en el gen *TYR*, y solo una mutación en el 15% de los pacientes (Hutton & Spritz, 2008). Este dato varía según la población pero todos los estudios concuerdan en que mayoritariamente se detectan dos mutaciones en un mismo gen en individuos con sospecha de albinismo oculocutáneo, pero en algunos individuos solo se detecta una sola mutación en ese gen incluso habiendo analizado los 4 genes asociados a albinismo oculocutáneo (Gargiulo *et al.*, 2011; Grønskov *et al.*, 2009; Hutton & Spritz, 2008).

FAMILIA	ADN	PARENTESCO	MUTACIÓN EN GEN TYR		MUTACION EN GEN OCA2		MLPA Salsa p325
			Mutación 1	Mutación 2	Mutación 1	Mutación 2	
OCALB-1	09/0031	Probandus-	N/A	N/A	Delección del exón 7 (+/+) <i>Durham-Pierre (1994) Nat Genet 7, 176</i>	Delección del exón 7 (+/+) <i>Durham-Pierre (1994) Nat Genet 7, 176</i>	Delección del exón 7 y delección parcial un fragmento del exón 6 (+/+) <i>Durham-Pierre (1994) Nat Genet 7, 176</i>
	09/0032	Madre	N/A	N/A	Delección del exón 7 (+/-) <i>Durham-Pierre (1994) Nat Genet 7, 176</i>	-	Delección del exón 7 y delección parcial un fragmento del exón 6 (+/-) <i>Durham-Pierre (1994) Nat Genet 7, 176</i>
OCALB-2	09/0303	Probandus	p.Ser145Pro (+/-) <i>En este estudio</i>	-	Exones 6, 7 y 13: Negativo	-	Negativo
	09/0386	Marido	-	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
	11/1197	Hermana	-	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
	11/1198	Hermana	p.Ser145Pro (+/-) <i>En este estudio</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
	11/1199	Hermana	-	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
OCALB-3	09/1353	Probandus	p.Pro81Leu (+/+) <i>Giebel (1990) Proc Natl Acad Sci U S A 87, 3255</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
OCALB-4	09/1537	Probandus	p.Arg217Trp (+/-) <i>Tripathi (1992) Am J Med Genet 43, 865</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
OCALB-5	09/1738	Probandus	p.Arg212Lys (+/-) <i>King (2003) Hum Genet 113, 502</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
	09/1739	Padre	-	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
	09/1740	Madre	p.Arg212Lys (+/-) <i>King (2003) Hum Genet 113, 502</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
OCALB-6	10/1526	Probandus	p.Pro128Gln/s*12 (+/-) <i>En este estudio</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
	10/1608	Padre	p.Pro128Gln/s*12 (+/-) <i>En este estudio</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo
	10/1609	Madre	-	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo	-	Negativo

Tabla 4.9. Resumen de las mutaciones detectadas en los individuos con indicación de albinismo oculocutáneo y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger del gen TYR y de los exones 6, 7 y 13 del gen OCA2 y mediante MLPA empleando el kit p235. (+/+) homocigosis; (+/-) heterocigosis (*continúa*).

FAMILIA	ADN	PARENTESCO	MUTACIÓN EN GEN TYR		MUTACION EN GEN OCA2		MLPA Salsa p325
			Mutación 1	Mutación 2	Mutación 1	Mutación 2	
OCALB-7	10/2149	Probandus-	Negativo	Negativo	Exones 6, 7 y 13: Negativo		Negativo
	10/2150	Padre	Negativo	Negativo	Exones 6, 7 y 13: Negativo		Negativo
	10/2151	Madre	Negativo	Negativo	Exones 6, 7 y 13: Negativo		Negativo
OCALB-8	11/0796	Probandus	p.Met252Arg (+/-) <i>En este estudio</i>	-	Exones 6, 7 y 13: Negativo		Negativo
OCALB-9	11/2301	Probandus	p.Gly47Asp (+/-) <i>Oetting (1993) Am J Hum Genet 52, 17</i>	p.Arg217Trp (+/-) <i>Tripathi (1992) Am J Med Genet 43, 865</i>	Exones 6, 7 y 13 Negativo		Negativo
	11/2302	Padre	p.Gly47Asp (+/-) <i>Oetting (1993) Am J Hum Genet 52, 17</i>	-			
	11/2303	Madre	-	p.Arg217Trp (+/-) <i>Tripathi (1992) Am J Med Genet 43, 865</i>			
OCALB-10	10/1023	Probandus	Negativo	Negativo	p.Arg419Gln (+/-) <i>Rebeck (2002) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11, 782</i>	-	Negativo
OCALB-11	12/0155	Probandus	p.Arg402Gln (+/-) <i>Sulem P. et al. (2007) Nat Genet 39(12):1443-52.</i>	p.Ala490SerdupT (+/-) <i>Chintamane (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88, 5272</i>	Exones 6, 7 y 13 Negativo		Negativo
	12/0156	Padre	p.Arg402Gln (+/-) <i>Sulem P. et al. (2007) Nat Genet 39(12):1443-52.</i>	-	Exones 6, 7 y 13 Negativo		Negativo
	12/0157	Madre	-	p.Ala490SerdupT (+/-) <i>Chintamane (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88, 5272</i>	Exones 6, 7 y 13 Negativo		Negativo

Tabla 4.9 (continuación). Resumen de las mutaciones detectadas en los individuos con indicación de albinismo oculocutáneo y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger del gen TYR y de los exones 6, 7 y 13 del gen OCA2 y mediante MLPA empleando el kit p235. (+/-) heterocigosis

No todas las mutaciones en el gen *TYR* tienen el mismo efecto en la proteína. En general, las mutaciones que producen alelos nulos o mutaciones de inserción o deleción se esperaría que causaran una proteína totalmente no funcional y por tanto un fenotipo OCA1A, en cambio que las mutaciones de cambio de aminoácido ocasionaran una mutación con actividad residual de la enzima tirosinasa y por tanto un fenotipo OCA1B (Grønskov *et al.*, 2007). Sin embargo, algunas de éstas ultimas mutaciones no ocasionan un fenotipo OCA1B. Este tipo de mutaciones se encuentran agrupadas principalmente en 5 grupos: en el dominio N terminal, en el dominio A de unión a cobre, en el dominio B de unión a cobre, en el dominio transmembrana y en el dominico C terminal (Ray *et al.*, 2007). Estas regiones parecen ser clave para el funcionamiento de la enzima y por tanto las mutaciones que afecten a estas regiones podrían alterar la unión del sustrato a la enzima (tirosina o L-Dopa) o incluso el dominio catalítico de la proteína.

Todas las mutaciones que fueron identificadas en este estudio se localizan en el dominio melanosómico interno, excepto una que se encuentra localizada en el dominio transmenbrana. Concretamente, tres mutaciones se encontraron ubicadas en la región catalítica de la proteína, dos mutaciones están situadas entre el dominio de crecimiento epididérmico y el dominio A de unión a cobre y las otras dos mutaciones entre el dominio péptido señal y el dominio de crecimiento epidérmico (*figura 4.58*). Las mutaciones que caen en la región entre los dos dominio de unión a cobre podrían afectar a la distancia necesaria para la yuxtaposición con dos átomos de cobre crítica para la actividad catalítica de la proteína (Ray *et al.*, 2007).

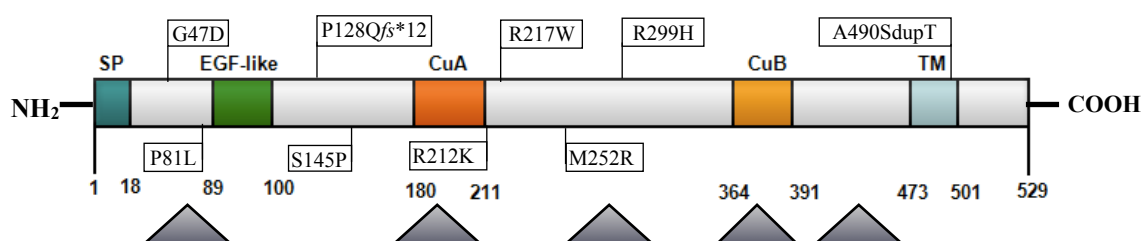


Figura 4.58. Representación esquemática de las mutaciones identificadas en los pacientes con albinismo oculocutáneo analizados en este estudio, localizándolas en los dominios proteicos de la tirosinasa.

La mutación p.Pro81Leu, que es una de las mutaciones más frecuentes en pacientes caucásicos hispánicos no latinos, (Hutton & Spritz, 2008), fue detectada en homocigosis en el individuo IV:2 de la familia **OALB-3** de origen Español, en la que los padres eran primos hermanos. Aunque en un principio el individuo IV:2 parecía presentar un fenotipo tipo OCA1B teniendo en cuenta el color amarillento del pelo, dado la subjetividad de la evaluación del mismo, se decidió finalmente diagnosticarlo como OCA1A, ya que esta mutación ha sido repetidamente asociada a este fenotipo en tres pacientes diferentes que presentaban dicha mutación en homocigosis (Hutton & Spritz, 2008).

En el estudio de Oetting y colaboradores en 1993, se sugirió que esta mutación podría tener su origen en las Islas Canarias, mediante estudio de haplotipos y que debido a los diferentes viajes de expedición histórica establecidos por colonizadores españoles hacia la isla de Puerto Rico (*figura 4.59.*), por medio de un efecto fundador se explicaría su aparición en otras poblaciones como Puerto Rico (Oetting *et al.*, 1993). En esta publicación, los autores llegan a la misma conclusión para la mutación p.Gly47Asp (Oetting *et al.*, 1993).

Una posterior publicación donde hallaron con una alta frecuencia esta mutación en población judía marroquí expuso que o bien la mutación procede de una población indígena de judíos marroquíes o bien fueron introducidos por los sefardíes cuando fueron expulsados de España a otros países del mediterráneo en 1492. La proximidad geográfica, la relación política entre España y Marruecos así como la exploración histórica de navegantes españoles de Islas Canarias a las islas de Puerto Rico, sugiere que el hallazgo de esta mutación en estas tres poblaciones diferentes es un indicativo claro de un origen genético común (Gershoni-Baruch *et al.*, 1994).

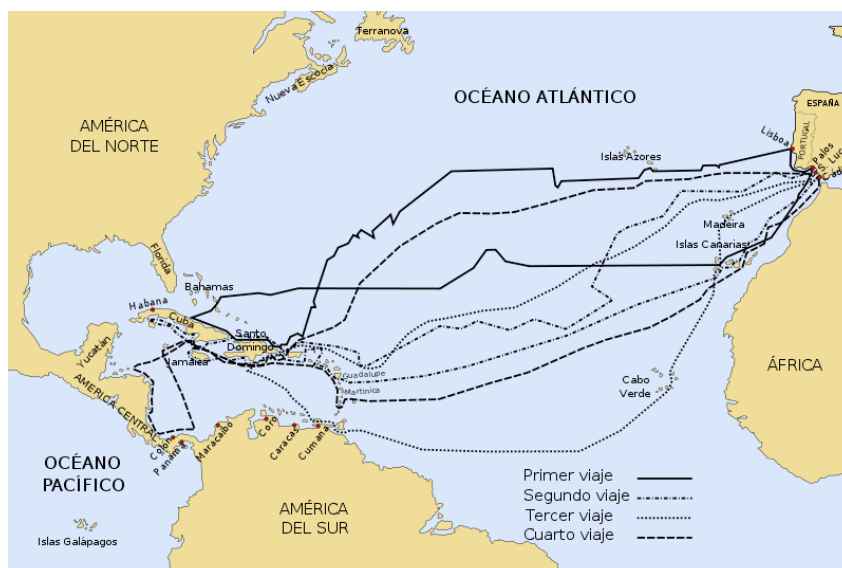


Figura 4.59. Expediciones históricas de Colón hacia la Isla de Puerto Rico. Posible explicación de la aparición de la mutación *p.Pro81Leu* de origen Español en Puerto Rico.

Esta última mutación fue identificada junto con la mutación *p.Arg217Trp*, en el *probandus* de la familia **OALB-9**, que presentaba un fenotipo OCA1A, tal y como se ha reportado anteriormente (King *et al.*, 2003; Tripathi *et al.*, 1992). Ambas mutaciones fueron segregadas en la familia y se confirmó el estado portador de los padres para dichas mutaciones. Sin embargo, en la consulta se apreció que en el caso del padre manifestaba algunas características compatibles con fenotipo OCA1B similares a un hermano suyo (tío del *probandus*: individuo II:1). Se realizó el estudio de la región codificante del gen *TYR* a fin de hallar la segunda mutación en el padre del *probandus*; sin embargo, no se detectó la segunda mutación.

Por otro lado y dado que en muchos estudios no se detecta la segunda mutación en el gen *TYR*, se procedió al análisis mediante microsatélites y se observó que tanto el individuo II:1 como II:4 (*figura 4.60.*), compartían el mismo haplotipo por lo que se sugiere que la segunda mutación podía localizarse en regiones intrónicas del gen, en el promotor o en otras regiones reguladoras del mismo. Aunque en las patologías autosómicas recesivas los portadores no presentan sintomatología, desde el punto de vista observacional, parece que los padres de individuos albinos presentan fenotipo leve. Sin embargo, para ello serían necesarios más estudios al respecto que probablemente arrojarían resultados muy interesantes al respecto, a tener en cuenta.

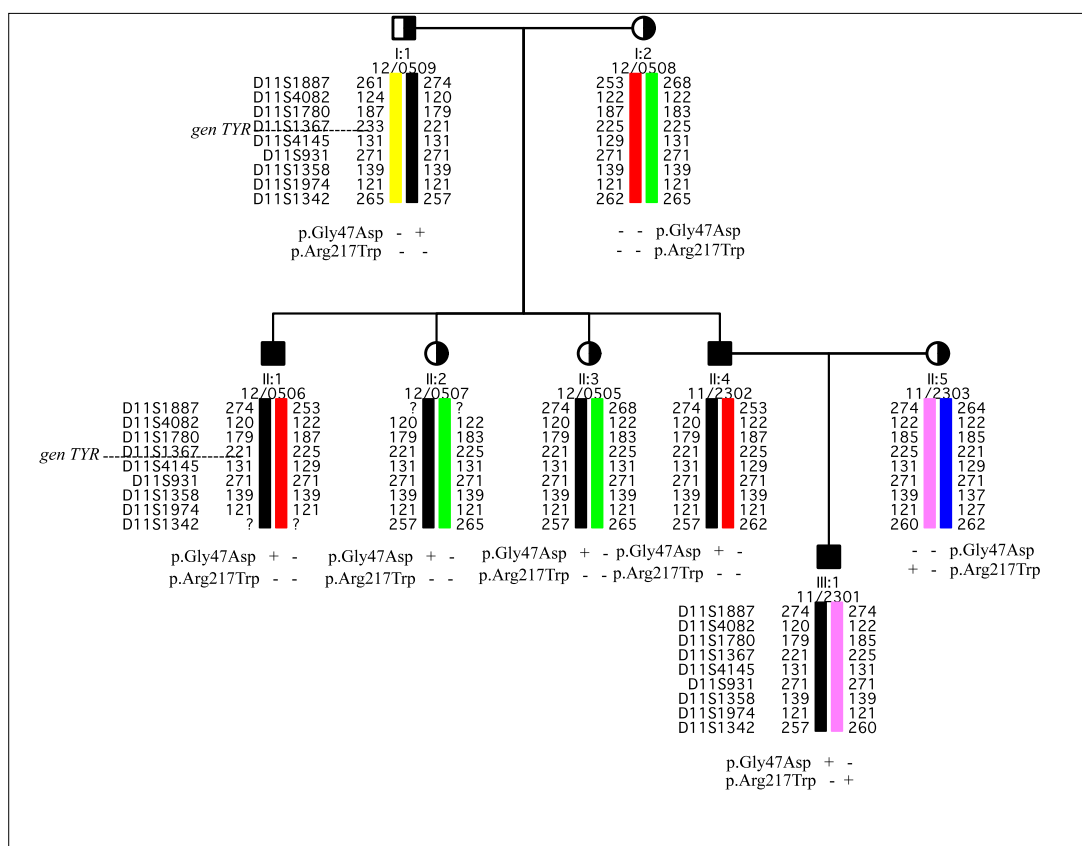


Figura 4.60. Análisis de haplotipos empleando microsatélites polimórficos cercanos al gen TYR, y segregación familiar de las dos mutaciones identificadas en el individuo III:1 de la familia OCALB-9.

En las familias **OCALB-5** y **OCALB-6** se identificó al mutación p.Arg299His previamente identificada en en el 12.5% de individuos caucásicos (Tripathi *et al.*, 1992). Se asocia mayoritariamente a pacientes con albinismo tipo OCA1A (Gershoni-Baruch *et al.*, 1994) tanto en homocigosis como en heterocigosis compuesta en combinación con otra (A. Wei *et al.*, 2010). Al igual que los individuos: III:1 de la familia **OCALB-5** que presentaba la mutación p.Arg299His en combinación p.Arg212Lys y III:4 de la familia **OCALB-6**, al que se le identificó la p.Arg299His junto con la mutación p.Pro128Glnfs*12 (c.183delC); ambos presentaban un fenotipo OCA1A.

Otra de las familias donde se encontraron dos cambios, fue la familia **OCALB-11**, donde se identificó por un lado, la mutación p.Ala490SerdupT (c.1467dupT), localizada en el dominio transmembrana, que parece afectar a su anclaje en la membrana del melanosoma ya que la inserción de una timina en el codon 490 conlleva a la pérdida de los 21 aminoácidos del dominio carboxilo terminal; lugar donde se hallan secuencias diana para que los peroxisomas modifiquen los melanosomas (Chintamaneni *et al.*, 1991).

Por otro lado, se detectó el alelo p.Arg402Gln descrito, en 1991, como variante no patogénica con actividad enzimática termoinestable (Tripathi *et al.*, 1991). Sin embargo, ha existido mucha controversia en cuanto a su participación en el fenotipo albino. Grønskov y colaboradores en 2009, lo consideraron como un alelo hipomórfico, es decir un alelo con funcionalidad reducida, que podría ir asociado a individuos con fenotipo albino que solo presentan una mutación identificada en el gen *TYR*. Como la distribución de frecuencias alélicas en sus pacientes era similar a la encontrada en la población CEU de HapMap: G/G (R/R) 0.67, A/G (Q/R) 0.333, A/A (Q/Q) 0.05 concluyeron que esta variante no contribuye al fenotipo albinismo (Grønskov *et al.*, 2009).

Sin embargo, en un estudio posterior, Chiang y colaboradores en 2009, afirmaron que el alelo p.Arg402Gln estaba claramente asociado a pacientes caucásicos con albinismo, que solo tenían identificada una mutación en el gen *TYR* y que debido a la combinación de los efectos de las mutaciones, los alelos hipomórficos, las variantes, el fondo genético y las influencias ambientales; el diagnóstico de un paciente basado solamente en el fenotipo frecuentemente no se correlaciona con el genotipo. De esta forma, sugirieron que en individuos con complexión oscura, como los Africanos, se identifican con mayor facilidad dos mutaciones, ya que serían necesario dos mutaciones para “antagonizar” la vía de pigmentación y producir un fenotipo visible; en individuos de complexión más clara, como los caucásicos, el albinismo oculocutáneo aislado puede mostrarse en un amplio espectro fenotípico dependiendo de la presencia de dos mutaciones o de la combinación de una mutación y un alelo hipomórfico o un alelo específico de la etnia (Chiang *et al.*, 2009). Sin embargo, en la elevada variabilidad de la pigmentación del iris, del pelo o de la piel parecen estar interviniendo del orden de centenas de genes en individuos de origen europeo y las interacciones gen a gen en dichos individuos podrían ser el factor más importante de dicha variabilidad (Branicki *et al.*, 2009).

En las familias **OALB-2**, **OALB-4** y **OALB-8**, se identificaron los siguientes cambios p.Ser145Pro, p.Arg217Trp, p.Met252Arg respectivamente, donde el primero y último se identificaron por primera vez en este estudio. Como ya se ha comentado anteriormente la mutación p.Arg217Trp ha sido asociada con anterioridad al fenotipo OCA1A (King *et al.*, 2003; Tripathi *et al.*, 1992) y su ubicación se encuentra en la región catalítica de la proteína, al igual que p.Met252Arg, por lo que esta última parecen alterar también la actividad de la enzima tirosinasa.

Este último alelo (p.Met252Arg), que no había sido descrito con anterioridad en la literatura científica, no se detectó en la base de datos del proyecto 1000 genomas y además la predicción bioinformática tanto SIFT como polyphen determinaron que este cambio era patogénico con un valor de 0 y de 0.881, respectivamente. Por otro lado, se había descrito una mutación en el codon adyacente; la mutación p.Glu253Arg asociada a OCA1A (Spritz *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia de la mutación p.Arg217Trp y p.Gly253Arg, el fenotipo del individuo afecto era compatible con OCA1B o incluso con OCA2. Sin embargo, serían necesario estudios más exhaustivos para confirmar este planteamiento.

La mutación p.Ser145Pro identificada en el *probandus* de la familia **OALB-2**, consistía en un cambio consecutivo en heterocigosis de dos cisteínas en el codon 145. Este cambio también se detectó en una de las hermanas sanas (ADN: 11/1198). Para determinar si ambas hermanas presentaban el mismo haplotipo se realizó un análisis mediante microsatélites y se observó que en la muestra 09/0386, un haplotipo era común con el de la muestra 11/1198 y otro con el resto de las hermanas. Además, el haplotipo restante de la muestra 11/1198 era diferente al resto de las hermanas sanas. Por lo que esto sugiere que la mutación se hereda con el haplotipo, 179-235-131-107-247 marcado como amarillo en el árbol (*figura 4.61*).

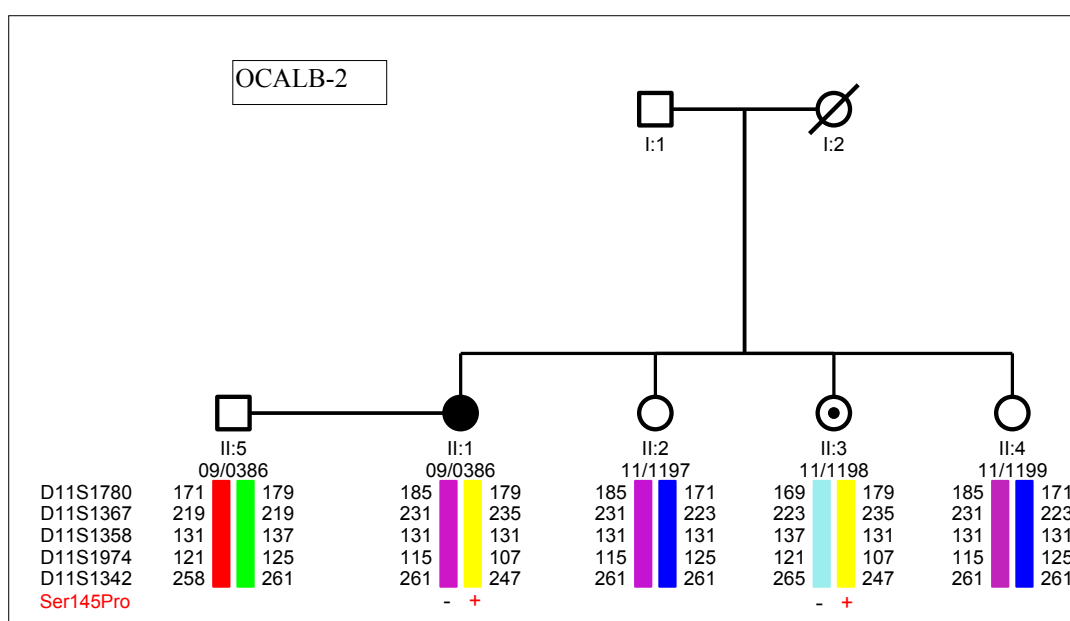


Figura 4.61. Análisis de haplotipos empleando microsatélites polimórficos cercanos al gen *TYR*, y segregación familiar de la mutación identificada en el individuo III:1 de la familia OALB-2.

Sin embargo, dado que no se identificó la segunda mutación en el gen *TYR* que explicara el fenotipo en el *probandus* y dado que el fenotipo era compatible con OCA2, se sugiere que, o bien podría presentar una mutación en el gen *TYR* en región reguladora con actividad residual de la enzima, o bien presentar mutaciones en el gen *OCA2*, ya que es el fenotipo más común africano con una prevalencia de 1:3.900 en población sudafricana (Kromberg & Jenkins, 1982) y 1:10000 entre africanos americanos (Oetting & King, 1999).

Teniendo en cuenta que tanto la familia OCALB-1 como OCALB-2 de las familias eran de la población africana, se realizó en primer lugar el estudio del exón 7 del gen *OCA2*, previo al análisis de la región codificante del gen *TYR*, ya que la delección de 2.7 Kb en homocigosis es la mutación más frecuente en pacientes con albinismo Africanos subsaharianos (Durham-Pierre et al., 1994). La amplificación se realizó mediante PCR convencional empleando cebadores del exón 7, para determinar la presencia o ausencia de este amplicón en los miembros afectados de las familias africanas y empleando simultáneamente los cebadores del exón 6 y exón 13 como control positivo de la reacción.

En el individuo afecto de la familia **OCALB-1** se detectó ausencia de amplificación del exón 7, no así para la paciente afecta de la familia OCALB-2. Para confirmar mediante otras metodologías, que la ausencia de amplificación en la muestra 09/0031 se debía realmente a una delección en homocigosis y no a un fallo de la reacción, se emplearon las tres parejas de cebadores cebadores, denominados MHB descritos previamente (Durham-Pierre et al., 1994), y se amplificaron simultáneamente (*figura 4.62.*).

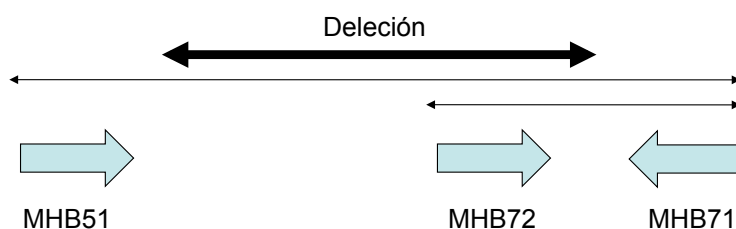


Figura 4.62. Esquema representativo de la estrategia molecular para determinar la presencia o ausencia de la delección de 2,7Kb frecuente en pacientes con albinismo Africanos subsaharianos. Empleando los cebadores MHB-51, MHB 71 y MHB72 descritos por (Durham-Pierre et al., 1994).



Figura 4.63. Resultado de la migración electroforética de los amplicones resultantes, tras la PCR empleando simultáneamente los cebadores MHB-51, MHB 71 y MHB72 en las muestras del probandus, de la madre de éste de la familia OCALB-1, y de una muestra control.

Mediante este diseño se esperaría que los pacientes homocigotos para la delección de 2.7 Kb presentaran una única amplificación de 820 pb, como resultado de la combinación de la falta de 2,7 kb de ADN genómico, y la amplificación llevada a cabo por los cebadores MHB51 y MHB-71, ya que el cebador MHB-72 no hallaría región homóloga para hibridar al existir la delección. Los pacientes con la delección en heterocigosis presentarían dos amplicones uno de 820 pb y otro de 240 pb, ya que el alelo con la delección tendría el amplicón resultante igual al anterior,

mientras que el alelo con la delección correspondería a la amplificación llevada a cabo por MHB-72 y MHB71, ya que la distancia entre MHB51 y MHB-71 es tan amplia que con las condiciones estándar empleadas para la amplificación, no se genera ningún amplicón entre estos dos cebadores (Durham-Pierre et al., 1994). Los resultados confirmaron lo esperado para la familia OCALB-1 donde el individuo IV-6 (muestra 09/0031) con un amplicón de 820 pb, presenta la delección de 2.7 Kb en homocigosis, el individuo III-6 (muestra 09/0032), que es la madre del individuo anterior, presentaba dos amplicones uno de 820 pb y otro de 240 pb, y por tanto la delección de 2.7 Kb en heterocigosis, mientras que el individuo control de población española presentó una única amplificación de 240 pb (*figura 4.63.*).

Simultáneamente, se empleó la técnica de la cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real del exón 7 del gen *OCA2* como otra herramienta de confirmación de dichos resultados. Para realizar el análisis, se emplearon muestras de ADN a una concentración de 50 ng/μl de tres individuos: el individuo IV-6 (muestra 09/0031); su madre (muestra 09/0031) y una muestra de control de banco de sangre como control negativo de la delección. Se amplificó simultáneamente en la misma placa el gen *GAPDH* (control de amplificación) y el exón 7 del gen *OCA2* (región diana) para dichas muestras; en este segundo caso se realizó tres réplicas por individuo.

La amplificación a partir de la muestra (09/0032) comenzó la reacción exponencial un ciclo posterior al individuo control para el exón 7, confirmando la presencia de mitad de dosis para esta región en la madre del *probandus*, mientras que la muestra 09/0031 se comportaba de la misma forma que el control negativo. El comportamiento de las tres muestras para *GAPDH* fueron de la misma forma, lo que confirma que no se trata de un fallo de amplificación en el caso de la muestra 09/0031. Al realizar la cuantificación relativa mediante $2\Delta CT$ y tras la normalización de los datos, se observó el mismo resultado que con la anterior aproximación, es decir que la madre del *probandus* (09/0032) presentaba la delección del exón 7 en heterocigosis y en homocigosis el individuo 09/0031 (*figura 4.64.*).

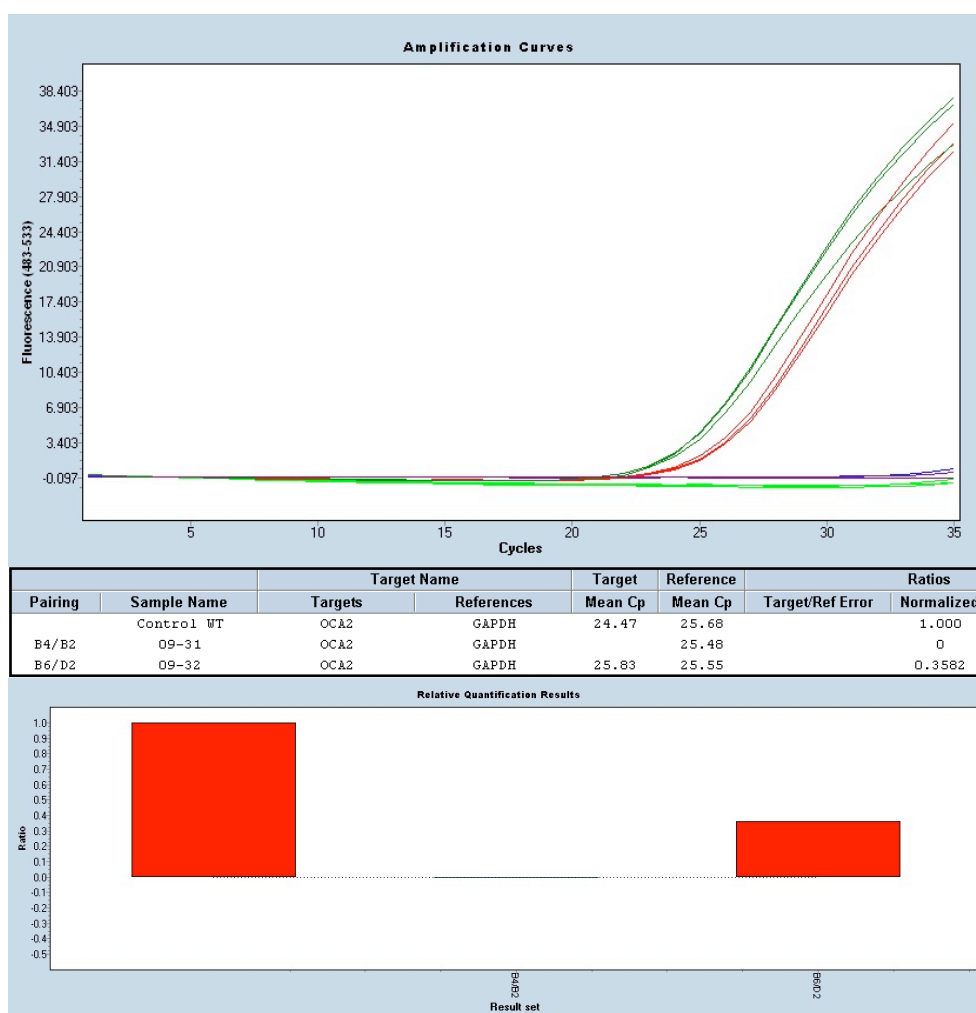


Figura 4.64. PCR a tiempo real de las muestras 09/0031 (línea morada), 09/0032 (curva roja) de la familia OCA1B-1, así como de una muestra control (curva verde). Asimismo se muestra la normalización de los ratios de los ciclos donde comienza la punto de inflexión de la curva exponencial (C_p) del gen *OCA2* (gen diana) entre el C_p del gen *GAPDH* (gen de referencia).

A finales del 2011, MRC-Holland habilitó un nuevo kit de MLPA para la enfermedad de albinismo oculocutáneo, que incluía sondas para el gen *TYR* y para el gen *OCA2*. Se realizó por tanto, el estudio mediante MLPA, no solo a la familia OCALB-1 sino también a todos los pacientes no caracterizados, con la intención de identificar deleciones o duplicaciones en las regiones codificantes de los genes *TYR* y *OCA2*. Se observó que en el diseño de este kit, no tuvieron en cuenta la existencia del pseudogen de TYRL. Éste se encuentra localizado en la región cromosómica 11p11.2-cen y su secuencia presenta una homología del 98.55% que coincide mayoritariamente en el exón 4 y 5 del gen *TYR* (Chaki *et al.*, 2005). Las sondas diseñadas para la hibridación genómica de los exones 4 y 5 son capaces de unirse al gen y al pseudogen, por lo tanto, en los pacientes estudiados no se puede descartar que no tengan deleciones en dichos exones. En estos casos habría que continuar el estudio con otros métodos como la qPCR. En el caso del OCALB-1 se volvió a confirmar la presencia de la deleción del exón 7 en homocigosis en el individuo 09/0031 y en heterocigosis en la muestra 09/0031 (*figura 4.65*).

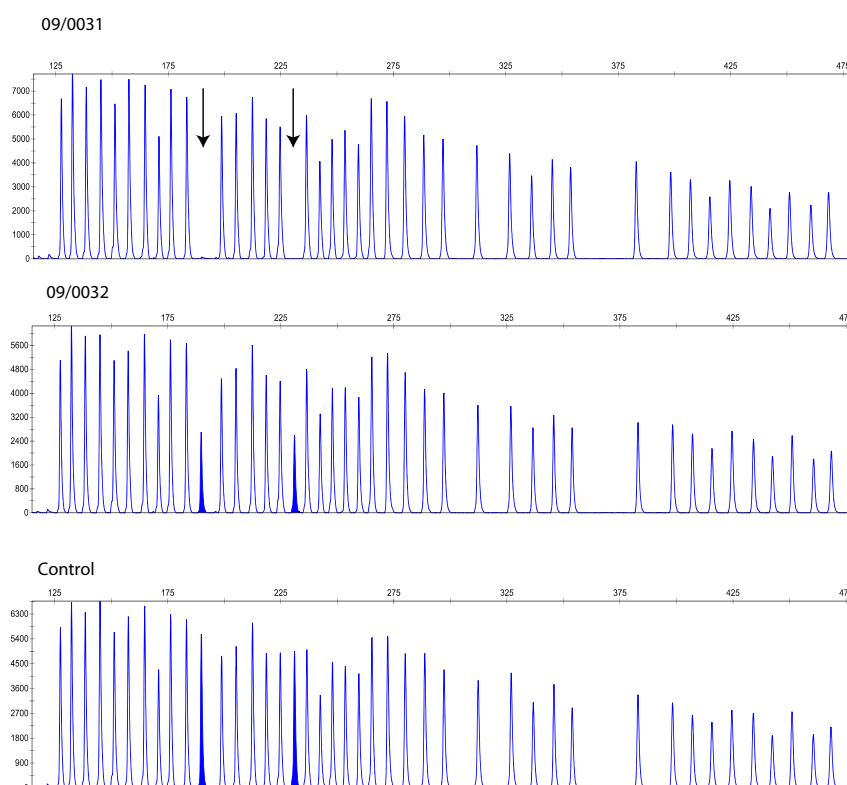


Figura 4.65. Resultado del kit p325 de MLPA en las muestras 09/0031 (probandus), 09/0032 (madre del probandus) y una muestra control. En la muestra 09/0031, las flechas indican la ausencia de amplificación de las sondas (sombreadas en azul): 14284-L16595 que hibrida en el intrón 6 de *OCA2* y 14291-L17801 que hibrida en el exón 7 del gen *OCA2*. En la muestra 09/0032 se observa una disminución del 35-50% de estas sondas comparadas con el control.

En el resto de los pacientes, se pudieron descartar deleciones y duplicaciones en las regiones codificantes de los genes *OCA2* y del exón 1 al 3 del gen *TYR*. De esta forma, en el individuo OCALB-2, aunque se había descartado la deleción de 2.7 kb en homocigosis mediante el resultado del gel de agarosa, se pudo descartar la presencia de la deleción en heterocigosis. El resultado de MLPA, permitió además confirmar que la mutación p.P81L identificada en el individuo IV:2 de la familia OCALB-3, y localizada en el exón 1 del gen *TYR*, realmente se hallaba en homocigosis en lugar de hemicigosis.

A todas las familias de albinismo oculocutáneo incluidas en este estudio se realizó el estudio del exón 7 y 13 del gen *OCA2*, puesto que en estos exones son los exones más frecuentemente mutados en individuos con albinismo oculocutáneo tipo 2 (Hutton & Spritz, 2008) y se completó el estudio con el exón 6 empleado para acotar la región de la deleción de 2,7 kb. De las dos familias a las que no se les habían detectado ninguna mutación en el gen *TYR*, en el individuo afecto de la familia **OCALB-10** se detectó un cambio en heterocigosis en el exón 13: p.Arg419Gln (rs1800407). Esta variante fue una de las primeras variantes asociadas al color de iris verde, donde esta variante en heterocigosis es suficiente para este efecto (Rebbeck *et al.*, 2002). El paciente afecto de la familia OCALB-10 presentaba los ojos azules por lo tanto, podría existir otro gen que podría interactuar para producir el color de iris azul (Branicki *et al.*, 2009). De todas formas, sería necesario estudiar este gen completo para identificar o descartar mutaciones en el resto de las regiones codificantes en este gen.

En definitiva, aunque solo se ha podido realizar el análisis de la región codificante del gen *TYR* y el estudio parcial del gen *OCA2*, no se descartan mutaciones en el resto de los exones del gen *OCA2* o incluso mutaciones en otros genes relacionados con albinismo oculocutáneo aislado así como mutaciones en las regiones reguladoras de estos genes. Las regiones intergénicas e intrónicas, se les había considerado durante mucho tiempo como parte de ADN sin función conocida y a la que se le atribuía un papel de acumulación de mutaciones sin que ejerciera una alteración en los regiones codificantes. Sin embargo, gracias a los estudios de las regiones reguladoras y por lo que se ha podido observar en el proyecto ENCODE (Encode Project Consortium *et al.*, 2012), estas regiones tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión de los genes colindantes o incluso pueden proporcionar protección de la acción de otras zonas reguladoras correspondientes a genes adyacentes.

La importancia de estas zonas reguladoras en el albinismo oculocutáneo se pudo observar en la creación de ratones transgénicos modelos de OCA1. Los ratones a los que le falta el elemento LCR (*Locus Control Region*) localizado *upstream* de la región codificante del gen de la tirosina presentan un fenotipo abigarrado, en comparación con aquellos ratones transgénicos que contienen la construcción completa con la que se rescata el fenotipo silvestre de pigmentación (Giménez *et al.*, 2001; Montoliu *et al.*, 1996).

Sin embargo, a pesar de la parcialidad del presente estudio, los resultados son similares a los realizados por otros autores (Hutton & Spritz, 2008). A pesar de todos los estudios realizados mundialmente, parece hay una alta incidencia de individuos con una sola mutación detectada, lo que indica que posiblemente existan otros genes que estén involucrados en esta patología, aún no caracterizados. De todas formas, no existe uniformidad en cuanto todos estos estudios, no todos han analizado los 4 genes asociados a albinismo oculocutáneo aislado, pero incluso en los estudios en los que se han analizado todos los genes, existe una alta frecuencia de individuos donde solo se detecta una única mutación. En general, todos los estudios coinciden en que se ha analizado solamente la región codificante, lo que sugiere que o bien las mutaciones se encuentran en región reguladora o bien pueden existir otros genes aún no reportados y por tanto no caracterizados hasta el momento. En esta línea se acaba de proponer como nuevo gen de albinismo oculocutáneo el gen *SLC24A5* (Wei *et al.*, 2013a).

Posiblemente la existencia del pseudogen TYRL podría ser otra de las causas de la falta de detección de la segunda mutación en individuos con OCA1, porque podrían darse recombinaciones entre el gen y el pseudogen como ocurre en patologías como Incontinencia Pigmenti y Gaucher (Fusco *et al.*, 2012; Wafaei & Choy, 2004). Los reordenamientos resultantes de la interacción pueden generar alelos complejos (p.ej.: quimeras) con funcionalidad alterada que no se detectarían mediante secuenciación. Además, dado que las sondas de MLPA hibridan en el exón 4 y 5 del gen *TYR*, también hibridan en el TYRL las deleciones tampoco son detectadas. No obstante, observando que la detección de una sola mutación ocurre en todos los genes analizados, y teniendo en cuenta que solo el gen *TYR* presenta pseudogen, además de un mecanismo de interacción gen-pseudogen, otros mecanismos pueden influir dentro de esta misma patología.

Otra de las explicaciones de la detección de una única mutación y de la elevada variabilidad fenotípica en los individuos podría ser debido a la existencia de digenismo o trialelismo. En el estudio de Wei y colaboradores en 2013 han reportado pacientes que presentan mutaciones en dos genes distintos (Wei *et al.*, 2013b). No obstante, es necesario realizar estudios más exhaustivos para confirmar o descartar este mecanismo.

Otros de los mecanismos posibles puede ser la epistasia como consecuencia de una posible interacción génica. Las proteínas codificadas por genes asociados a albinismo oculocutáneo presentan una funcionalidad conjunta y participan en el mismo mecanismo bioquímico, por lo que estas proteínas pueden interactuar entre ellas, creando fenotipos intermedios. De hecho, se ha descrito este mecanismo en otros genes relacionados con la pigmentación (Hoyle, *et al.*, 2011).

Posiblemente, por todo esto, habría que empezar a considerar el albinismo con otro tipo de herencia compleja no mendeliana. Es posible que los estudios futuros puedan llegar a ser más aclaratorios en cuanto a la etiopatogenia de la enfermedad.

En aquellas pacientes donde no se ha detectado mutación, aunque pueden asimismo presentar mutaciones en otros genes asociados a albinismo oculocutáneo en regiones reguladoras o en otros genes aún no caracterizados, no se puede descartar que exista su sobrediagnóstico de OCA en pacientes con complexión fenotípica clara y que presenten otro tipo de retinopatía o neuropatía tal y como sugirieron Chiang y colaboradores en 2009.

Actualmente, el diagnóstico clínico de esta enfermedad no resulta sencillo, por lo que de aquí surge la necesidad de establecer guías clínicas para el diagnóstico de esta patología. En los países nórdicos, se complica aún más, teniendo en cuenta las características fenotípicas de la población en general en estos países. En cuanto al estudio molecular según el fenotipo es complicado, por lo que una vez se avance en la comprensión de esta patología se podrá establecer una correlación genotipo-fenotipo más ajustado. Actualmente en España, se está desarrollando una nueva plataforma de diagnóstico llamada Albinochip, que emplea la tecnología de Sequenom, y que incluye las más de 600 mutaciones asociadas a albinismo oculocutáneo.

Hasta ese momento, para dirigir el estudio molecular según el fenotipo se propone el siguiente diagrama de flujo (*figura 4.66.*):

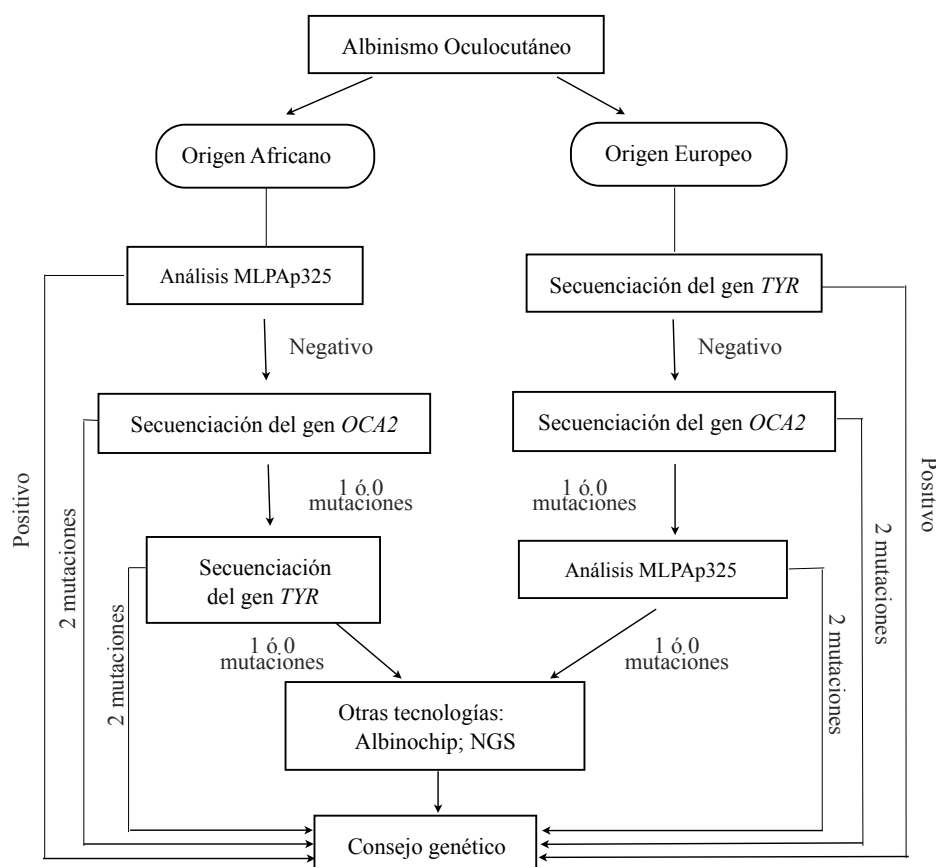


Figura 4.66. Diagrama de flujo recomendado para dirigir el estudio molecular de pacientes con indicación clínica de albinismo oculocutáneo aislado.

La caracterización molecular de los individuos con albinismo es necesaria no solo para conocer el tipo de albinismo, sino para poder ofrecer un adecuado consejo al paciente y a sus familiares. Además, recientemente están surgiendo nuevas estrategias terapéuticas para individuos con albinismo, como la administración de Nitisinona a individuos con albinismo OCA1B (Onojafe *et al.*, 2011). Esta estrategia surgió de la observación del tratamiento que reciben los individuos con Tirosinemia tipo 1, que sin tratamiento presentan una acumulación de metabolitos intermediarios que les provoca daño hepático y renal mortal, debido a la deficiencia de la enzima ácido fumailacetoácido hidrolasa.

La Nistisinona, medicamento aprobado por la FDA y por EMEA para el tratamiento de la tirosinemia hereditaria tipo 1, inhibe la enzima 4-hidroxilfenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) de la ruta catabólica de la tirosina, por lo que se bloquea la acumulación de los metabolitos tóxicos intermediarios y como mecanismo resultante se produce un aumento de los niveles de tirosina. Por lo que si se administra Nistisinona en individuos con actividad residual de actividad Tirosinasa se esperaría, siguiendo el equilibrio bioquímico de Michaelis Menten un aumento de los niveles de melanina así como los productos derivados de la melanogénesis. Esto se comprobó, en ratones mutantes que presentan la mutación Himalaya donde se observó un aumento de pigmento en el pelo de los ratones, así como en el RPE (Onojafe *et al.*, 2011).

Este medicamento se encuentra en fase preclínica 1 para determinar la toxicidad del medicamento (ClinicalTrials.gov; Identificador: NCT01682538). Sin embargo, dado que los hallazgos son a nivel de pigmentación, no se sabe si este aumento de pigmento mejorará los defectos visuales.

Lo que si se ha demostrado es que en ausencia de melanina y la presencia de L-DOPA en ratones transgénicos, restaura el desarrollo de la retina e impide la aparición de los defectos visuales característicos del albinismo (Lavado *et al.*, 2006). En este punto existe otra estrategia terapéutica que consiste en la administración de L-DOPA en individuos con albinismo para poder extrapolar los hallazgos detectados en ratón. Actualmente, esta terapia se encuentra en fase preclínica 2 (ClinicalTrials.gov; Identificador: NCT01176435).

En el año 2008 se propuso que L-DOPA podría ser un ligando endógeno de GPR143 (Lopez *et al.*, 2008), cuyas mutaciones son responsables de albinismo ocular. Si esto fuera así, esto explicaría la razón por la cual diferentes tipos de albinismo presentan los mismos defectos visuales.

4.2.6.2 ALBINISMO OCULAR TIPO 1

El albinismo ocular tipo 1 es el fenotipo más frecuente dentro del albinismo ocular y su herencia es ligada al cromosoma X. De todos los individuos que inicialmente se clasificaron con albinismo ocular, se excluyeron aquellos que o bien no presentaban una herencia ligada al X o bien el caso afecto era femenino. Aunque, si bien es cierto que se han descrito algunos casos de portadoras femeninas con signos clínicos leves, generalmente no presentan sintomatología debido al efecto aleatorio de la lyonización (Charles *et al.*, 1992).

Se realizó el estudio molecular del gen GPR143 en los varones afectados de un total de 13 familias no relacionadas (*tabla 4.10.*).

- En tres familias se detectó la mutación causal de la enfermedad: **OALB-1**, **OALB-3** y **OALB-8**. La mutación g.5815delA (c.328delA transcrito ENST00000380929) identificada en la familia **OALB-1**, fue descrita por primera vez por nuestro grupo en 2009 (Martínez-García *et al.*, 2010) y la mutación p.Cys136Arg (transcrito ENST00000380929) que fue detectada en la familia **OALB-8**, fue descrita en 1998 como p.Cys116Arg (Schnur *et al.*, 1998). La mutación p.Leu66SerdupTfs*54 (c. 206dupT del transcrito ENST00000380929) detectada en el *probandus* de la familia **OALB-3**, no fue descrita con anterioridad, pero al ser una inserción puntual de una timina y desplazar la pauta de lectura, ésta genera una proteína truncada.
- En las 10 familias restantes (**OALB-2**, **OALB-4**, **OALB-5**, **OALB-9**, **OALB-10**, **OALB-11**, **OALB-12**, **OALB-15**, **OALB-16** y **OALB-17**) no se detectaron mutaciones en ninguno de los exones del gen *GPR143*. Tampoco se detectaron deleciones o duplicaciones ni en este gen, ni en otros implicados en anomalías oculares incluidos en el kit p054 de MLPA. Aunque no se descartó que existiesen mutaciones en regiones intrónicas o en el promotor de este gen, parecía más plausible que presentasen otro tipo de anomalías oculares, ya que el fondo de ojo es similar a muchas otras anomalías y el nistagmo no es un signo patognomónico exclusivo del albinismo ocular. No obstante, de estas familias, las que presentaban detalles clínicos fueron revaluadas por si pudieran presentar algunas de ellas, albinismo oculocutáneo aislado y que al presentar actividad residual de la tirosinasa, se hubieran confundido clínicamente con albinismo ocular.

FAMILIA	ADN	PARENTESCO	MUTACIONES EN EL GEN <i>GPR143</i>	MLPA Salsa p054
OALB-1	07/0336	<i>Probandus</i>	g.5815delA (heterocigosis) <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>	Detección en heterocigosis de la región híbrida con exón 2 del gen <i>GPR143</i> <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>
	07/0581	Padre	g.5815delA (hemicigosis) <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>	Detección en hemicigosis de la región híbrida con exón 2 del gen <i>GPR143</i> <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>
	07/1356	Hermano	Negativo	Negativo
	07/1357	Tío	g.5815delA (hemicigosis) <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>	Detección en hemicigosis de la región híbrida con exón 2 del gen <i>GPR143</i> <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>
	07/1723	Prima	g.5815delA (heterocigosis) <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>	Detección en heterocigosis de la región híbrida con exón 2 del gen <i>GPR143</i> <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>
	07/1724	Prima	g.5815delA (heterocigosis) <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>	Detección en heterocigosis de la región híbrida con exón 2 del gen <i>GPR143</i> <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>
	07/1725	Prima	g.5815delA (heterocigosis) <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>	Detección en heterocigosis de la región híbrida con exón 2 del gen <i>GPR143</i> <i>Martínez-García M (2010) Clin Experiment Ophthalmol. 5:489</i>
	07/1726	Tía	Negativo	Negativo
	07/1727	Madre	Negativo	Negativo
	09/0281	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
OALB-2	09/0935	Madre	Negativo	Negativo
OALB-3	09/0936	Hermana	p.Leu66dupT/s*54 (heterocigosis) <i>En este estudio</i>	Negativo
	09/0937	Cuñado	Negativo	Negativo
	09/0938	Cónyuge	Negativo	Negativo
	09/0939	<i>Probandus</i>	p.Leu66dupT/s*54 (heterocigosis) <i>En este estudio</i>	Negativo
	09/0940	Hijo	p.Leu66dupT/s*54 (hemicigosis) <i>En este estudio</i>	Negativo
	09/0941	Sobrino	p.Leu66dupT/s*54 (hemicigosis) <i>En este estudio</i>	Negativo

Tabla 4.10. Resumen de las mutaciones detectadas en el gen *GPR143* en los individuos con indicación de albinismo ocular y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger y análisis de las muestras mediante MLPA empleando el kit p054 (*continúa*).

FAMILIA	ADN	PARENTESCO	MUTACIONES EN EL GEN <i>GPR143</i>	MLPA Salsa p054
OALB-4	07/0300	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
OALB-5	07/1365	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
	07/1366	Madre	Negativo	Negativo
OALB-8	08/1791	<i>Probandus</i>	p.Cys136Arg (hemicigosis) Anteriormente descrita como p.Cys116Arg por: <i>Schnur (1998) Am J Hum Genet 62, 800</i>	Negativo
	11/1879	Hermana	p.Cys136Arg (heterocigosis) Anteriormente descrita como p.Cys116Arg por: <i>Schnur (1998) Am J Hum Genet 62, 800</i>	Negativo
OALB-9	09/2047	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
	09/2048	Madre	Negativo	Negativo
OALB-10	10/0080	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
	10/0194	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
OALB-11	10/0195	Madre	Negativo	Negativo
	10/0196	Hijo Gemelo 1	Negativo	Negativo
OALB-12	10/0197	Hijo Gemelo 2	Negativo	Negativo
	10/0198	<i>Cónyuge</i>	Negativo	Negativo
	10/0199	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
OALB-15	11/0317	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
OALB-16	11/0875	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
	11/0874	Madre	Negativo	Negativo
OALB-17	11/0715	<i>Probandus</i>	Negativo	Negativo
	11/0716	Padre	Negativo	Negativo
	11/0717	Madre	Negativo	Negativo

Tabla 4.10 (continuación). Resumen de las mutaciones detectadas en el gen *GPR143* en los individuos con indicación de albinismo ocular y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger y análisis de las muestras mediante MLPA empleando el kit p054.

En la familia **OALB-1**, la *probandus* acudió a consulta de consejo genético para conocer las probabilidades de tener un descendiente con la misma patología ocular de su padre, que presentaba nistagmo congénito y dificultades en la adaptación a la oscuridad. Según los datos proporcionados por la paciente, el padre fue inicialmente diagnosticado con nistagmo ligado al X. Dado que el nistagmo no es un signo clínico exclusivo de albinismo, se decidió realizar el estudio molecular comenzando por el descarte de deleciones o duplicaciones en las regiones codificantes de genes involucrados en anomalías oftalmogénéticas, para lo cual se empleó la salsa p054 del kit de MLPA, analizando tanto la muestra de ADN de la paciente como la de ambos progenitores. En el caso del padre presentaba una ausencia de amplificación de la sonda correspondiente al exón 2 del gen *GPR143*, y la hija presentaba una disminución del 50% de la amplificación de la misma sonda al compararla con el patrón de MLPA de la madre, que ésta coincidía con el patrón de MLPA de un individuo control (Martínez-García *et al.*, 2010).

A fin de determinar si la deleción correspondía a una deleción interna al exón, a una deleción del exón entero o una deleción mayor al exón, se realizó en primer lugar una amplificación mediante PCR convencional del exón 2 del gen *GPR143*, a partir de las muestra de la *probandus* y de sus progenitores y se observó amplificación para las tres muestras. Se continuó el procedimiento con la secuenciación Sanger de los amplicones y se detectó en el padre una deleción de una adenina en hemicigosis: c.328delA y tal como cabría esperar la hija presentaba la mutación en heterocigosis, mientras que la madre presentaba un patrón normal para el exón 2 (*figura 4.67*). El codon 109 es un aminoácido conservado en la evolución y además se ha descrito que el exón 2 del gen *GPR143* tiene una alta susceptibilidad a deleciones (Micale *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se realizó un estudio del microsatélite OA-CA situado en el intrón 1 del gen, a fin de buscar la informatividad de dicho microsatélite y así optar a otra estrategia molecular para la determinación de la presencia o ausencia de la mutación en esta familia de una manera indirecta (*figura 4.68*). Este microsatélite fue informativo solo en la rama familiar formada por los individuos III:3, III:4, IV:3, IV:4 y IV:5, ya que el individuo afecto presentaba un único amplicón de 148 pb, mientras que el resto de los individuos presentaban dos alelos: uno de 148 pb y otro de 161 pb, indicando que el alelo 148 pb se hereda junto con la mutación.

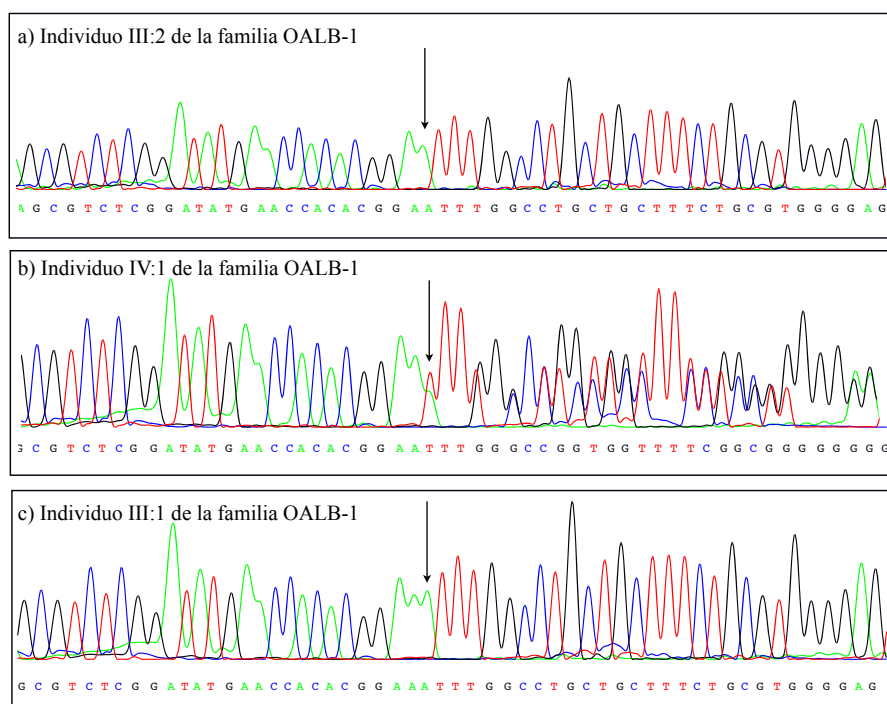


Figura 4.67. Análisis de la secuencia del exón 2 en la familia OALB-1. Las flechas indican la posición de la mutación c. 328delA. a) Electroferograma del individuo III:2 (padre de la probandus), en la que se observa que la mutación en hemisigosis; b) individuo IV:1 (probandus) presenta la mutación en heterocigosis y c) electroferograma del individuo III:1 correspondiente a una secuencia de un individuo sano.

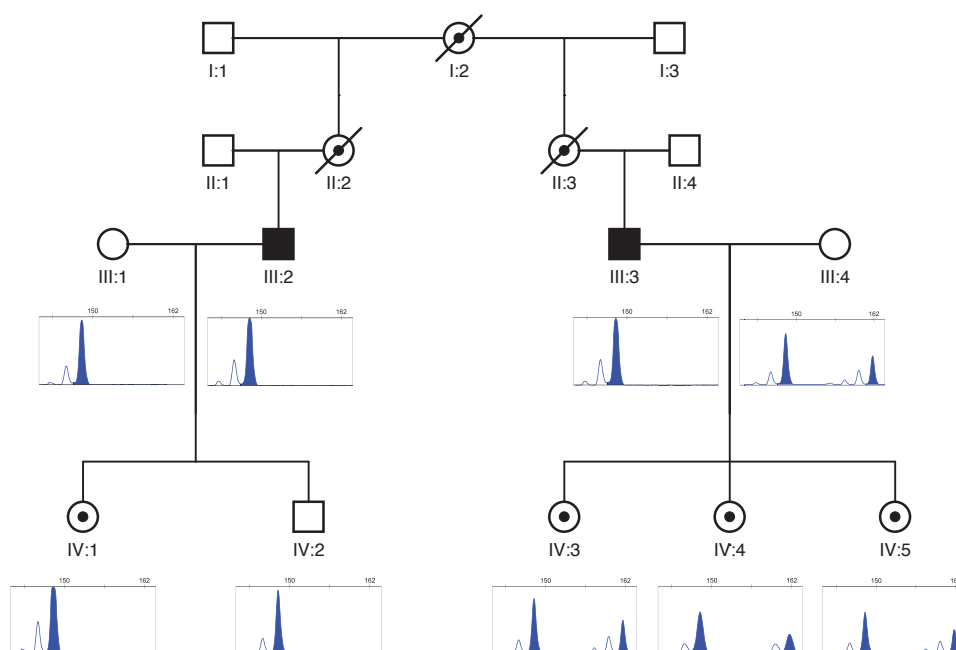


Figura 4.68. Análisis del microsatélite OA-CA en los diferentes miembros de la familia OALB-1. En la rama familiar formada por los individuos III:1, III:2, IV:1 y IV:2, se amplificó un único alelo de 148 pb tanto en los individuos sanos como afectados. Este análisis fue informativo, en la rama familiar formada por los individuos III:3, III:4, IV:3, IV:4 y IV:5 donde se observó una amplificación de un alelo 148 pb en el individuo afecto III:3 y dos alelos (148 pb y 161 pb) en los individuos restantes, indicando que el amplicón 148 pb se hereda junto con la mutación.

Posteriormente, al diagnosticar genéticamente al individuo III:2 con albinismo ocular, se derivó a éste y a la *probandus* al servicio de oftalmología para una evaluación oftalmológica exhaustiva. El fondo de ojo así como otros datos referidos, correspondían al fenotipo propio de albinismo ocular. En el fondo de ojo del individuo III:2 se observó una hipopigmentación de la retina así como una mácula anómala, mientras que en la evaluación oftalmológica de la *probandus* presentaba una hipopigmentación de la retina algo más ligera y se observaron conos miópicos (figura 4.69.).

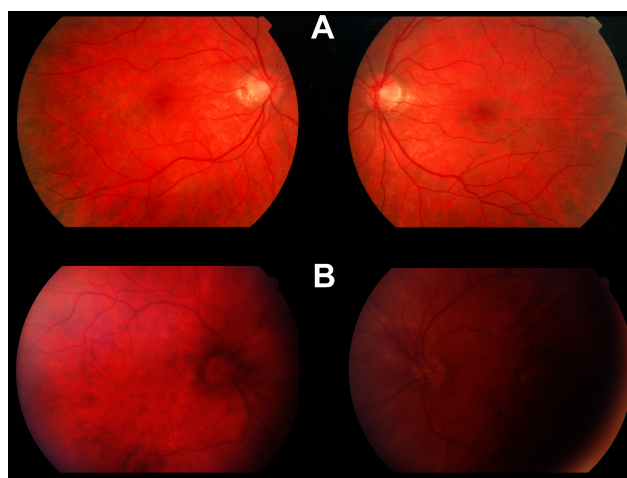


Figura 4.69. Evaluación oftalmológica del fondo de ojo: a) de la *probandus*, donde se observan conos miópicos y ligera hipopigmentación en la retina adyacente a la papila con visualización de vasos coroideos en la polo posterior de ambos ojos; b) del padre, donde se observa una ligera hipopigmentación y una mácula anómala.

Teniendo en cuenta que las familias **OALB-1**, **OALB-3** y **OALB-8** tenían identificada la mutación causante de la enfermedad y considerando el patrón de herencia ligada al cromosoma X de esta patología, aquellas parejas de estas familias que lo solicitasen podrían optar, entre otras opciones reproductivas, al diagnóstico genético prenatal no invasivo mediante la determinación del sexo fetal a partir de plasma materno (Lo *et al.*, 1997; Rijnders *et al.*, 2001). Esta determinación permite en el 50% de los casos, evitar un diagnóstico genético prenatal invasivo como es la biopsia corial o amniocentesis, ya que si el resultado es un sexo fetal femenino, o bien es el feto es portador o sano, por lo que a todos los efectos no tendría la sintomatología propia del albinismo ocular y disminuir así, el riesgo de pérdida fetal asociado a las técnicas invasivas. Ante un resultado de sexo fetal masculino, como el feto podría tener la mutación en el 50% de los casos, sería necesario confirmar la presencia o ausencia de la mutación familiar, mediante diagnóstico prenatal invasivo.

Normalmente, el diagnóstico genético prenatal no invasivo puede detectar mutaciones puntuales siempre y cuando la mutación proceda vía paterna, sin embargo, esto no es posible en una patología de herencia ligada al cromosoma X (*ver más detalle en pág. 211-213*). De todas formas, se están mejorando las técnicas para discernir entre muestra fetal y materna (Liao *et al.*, 2012), por lo que esto ayudaría a extrapolar el diagnóstico prenatal no invasivo otro tipo de patologías.

Tres parejas optaron por este método, la *probandus* de la familia Varios 213 (muestra DSF119), así como los individuos II:2 (DSF120) y II:3 (DSF183) de la familia OALB-3 (varios 400). En los tres casos se realizó la PCR a tiempo real de la coamplificación de los genes *GAPDH* y *SRY* en las correspondientes muestras, para confirmar que la ausencia del gen *SRY* es por un sexo fetal femenino y no por un fallo de la amplificación. En las tres muestras se observó amplificación de *GAPDH* y no amplificación de *SRY* por lo que los tres fetos al ser femeninos eran sanos (*figura 4.70.*).

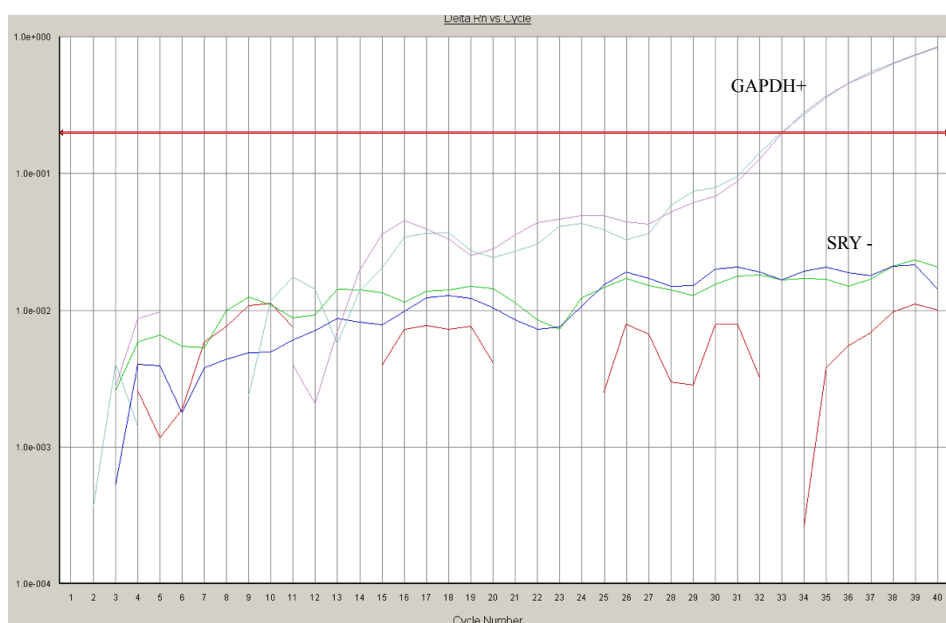


Figura 4.70. PCR a tiempo real de la coamplificación de los genes *GAPDH* y *SRY* en la muestra DSF-119. En esta gráfica se observa la amplificación de *GAPDH* y ausencia de amplificación de *SRY* para las dos réplicas de la muestra DSF-119. Este mismo patrón se observó en las muestras DSF120 y DSF-183.

En el resto de los individuos en los que no se detectó mutaciones puntuales en el gen *GPR143* (**OALB-2**, **OALB-4**, **OALB-5**, **OALB-9**, **OALB-10**, **OALB-11**, **OALB-12**, **OALB-15**, **OALB-16** y **OALB-17**), se realizó el estudio de MLPA empleando la salsa p054, que incluye sondas que hibridan en las regiones codificantes del gen *GPR143* entre otras regiones que se han asociado con anomalías oftalmogenéticas, a fin de descartar deleciones o duplicaciones en dichas regiones. En el 10% de los europeos y el 50% de los pacientes norteamericanos se han descrito deleciones intragénicas en el gen *GPR143* (Bassi *et al.*, 2001). Sin embargo, no se detectaron deleciones ni duplicaciones en las regiones analizadas mediante MLPA para ninguna de las muestras analizadas.

Teniendo en cuenta que algunos individuos mostraban un fenotipo más claro que el mostrado en su contexto familiar, en cuanto a la pigmentación de piel y pelo, se decidió proceder a la reevaluación clínica de todos los casos que tenían indicación de estudio del gen *GPR143*, por si alguna de las familias podrían manifestar albinismo oculocutáneo en lugar de albinismo ocular. Este fue el caso de las familias **OALB-12**, **OALB-15** y **OALB-16** y **OALB-17** (*tabla 4.11.-4.12.*), donde se realizó el estudio de albinismo oculocutáneo aislado, mediante la secuenciación Sanger de la región codificante del gen *TYR* y de los exones 6, 7 y 13 del gen *OCA2*. En los tres primeros casos (**OALB-12**, **OALB-15** y **OALB-16**) se detectó al menos una mutación en el gen *TYR* y en la última familia (**OALB-17**) se detectó una mutación en el exón 13 del gen *OCA2* (*tabla 4.13.*).

En la familia **OALB-12** los dos gemelos presentaban la variante p.Trp238Arg, aunque no había sido descrita con anterioridad, otra mutación en el mismo codon estaba asociada a albinismo OCA1A: p.Trp238* (Wei, *et al.*, 2011), sin embargo, se trata de un cambio por un codon de parada. No obstante, otra mutación estaba descrita en un codon adyacente: la mutación p.Arg239Trp (Nakamura *et al.*, 2002) que presenta el cambio inverso y está asociado a albinismo oculocutáneo tipo 1A, por lo que, se asemejaría más a lo que podría ocurrir en el cambio encontrado en la familia **OALB-12**. Además estos individuos presentaban la variante p.Arg402Gln en homocigosis (*ver más información sobre esta variante en OALB-11*).

En la familia **OALB-15**, se identificó una mutación en región reguladora: **c.1037-7A/T**, descrita por primera vez en 1993 (Spritz, 1993). Esta mutación ha sido descrita en diversas poblaciones siendo una de las mutaciones más frecuentes en pacientes caucásicos europeos asociado a albinismo oculocutáneo tipo 1B (Hutton & Spritz, 2008).

En la familia **OALB-16**, se detectó la mutación **p.Val73Glnfs*1**, que genera una proteína truncada. Esta mutación no había sido reportada en la literatura con anterioridad, por lo que ha sido identificada por primera vez en este estudio.

En la familia **OALB-17**, no se detectaron mutaciones en el gen *TYR*, pero tras el análisis de los tres exones del gen *OCA2*, se detectó la mutación **pThr450Met** en el exón 13 del gen *OCA2* descrita por primera vez en 2008 (Rooryck *et al.*, 2008). Como solo se analizó parcialmente este gen, es posible que la segunda mutación se encuentre localizada en otro exon de este mismo gen, por lo que sería necesario ampliar el estudio en dicha familia.

FAMILIA	PACIENTE	COLOR CUERO CABELLUDO	COLOR PELO CORPORAL	COLOR CEJAS	COLOR OJOS	COLOR PIEL
OALB-12	10/0196 10/0197	BLANCO que progresa a RUBIO	BLANCO que progresa a RUBIO	BLANCO que progresa a RUBIO	AZUL-CLARO	POCO PIGMENTADA
OALB-15	11/0317	RUBIO	CLARO	CLARAS	AZULES-GRISÁCEOS	MUY BLANCA
OALB-16	10/0875	RUBIO-CLARO	RUBIO-CLARO	RUBIAS-CLARO	CLAROS	PÁLIDA
OALB-17	11/0715	RUBIO	CLARO	RUBIAS	AZUL-VERDOSO	PÁLIDA

Tabla 4.11. Datos fenotípicos de pigmentación recogidos tras la revaluación de los individuos afectados de las familias OALB-12, OALB-15, OALB-16, OALB-17. Se detalla el color de pelo, iris y piel en el momento de la consulta en cada caso.

FAMILIA	DATOS OFTALMOLÓGICOS	ANTECEDENTES FAMILIARES
OALB-12	Fotofobia. Nistagmo bilateral	Gemelos monocigóticos
OALB-15	Nistagmo congénito. Fotofobia Fondo de ojo: parénquima tipo albino. Agudeza visual: 0.2-0.1. Campo visual reducido.	Padre y madre con pelo rubio, ojos azules y piel pálida. Hermano con hipopigmentación retiniana y pelo de color rubio
OALB-16	Endotropía intermitente del ojo izquierdo. Nistagmo rotario de mayor amplitud que frecuencia.	Madre Rubia de tez clara
OALB-17	Nistagmo congénito. Miopía. Estrabismo divergente alternante)	Madre rubia con ojos azules operada de estrabismo

Tabla 4.12. Datos oftalmológicos y antecedentes familiares recogidos tras la revaluación de los individuos afectados de las familias OALB-12, OALB-15, OALB-16, OALB-17.

FAMILIA	ADN	PARENTESCO	MUTACIÓN EN GEN TYR		MUTACION EN GEN OCA2		MLPA Salsa p325
			Mutación 1	Mutación 2	Mutación 1	Mutación 2	
OALB-12	10/0196	Gemelo 1	p.Trp238Arg (+/-) En este estudio	p.Arg402Gln (++) Sulem P. et al.(2007) Nat Genet 39(12):1443-52.	Exones 6, 7 y 13	Negativo	Negativo
	10/0197	Gemelo 2	p.Trp238Arg (+/-) En este estudio	p.Arg402Gln (++) Sulem P. et al.(2007) Nat Genet 39(12):1443-52	Exones 6, 7 y 13	Negativo	Negativo
	10/0198	Padre	-	p.Arg402Gln (+/-) Sulem P. et al.(2007) Nat Genet 39(12):1443-52	Exones 6, 7 y 13	Negativo	Negativo
	10/0199	Madre	p.Trp238Arg (+/-) En este estudio	p.Arg402Gln (+/-) Sulem P. et al.(2007) Nat Genet 39(12):1443-52	Exones 6, 7 y 13	Negativo	Negativo
OALB-15	11/0317	Probandus	c.1037-7T>A (+/-) Spritz (1993) Semin Dermatol 12, 167	-	Exones 6, 7 y 13	Negativo	Negativo
OALB-16	10/0875	Probandus	p.Val73Glyfs*1 (+/-) En este estudio	-	Exones 6, 7 y 13	Negativo	Negativo
	10/0874	Madre	-	-	Exones 6, 7 y 13	Negativo	Negativo
OALB-17	11/0715	Probandus	Negativo	Negativo	p.Trp450Met (+/-) Rooryck (2008) Pigment Cell Melanoma Res 21, 583;	-	Negativo
	11/0716	Padre	Negativo	Negativo	-	-	Negativo
	11/0717	Madre	Negativo	Negativo	p.Trp450Met (+/-) Rooryck (2008) Pigment Cell Melanoma Res 21, 583;	-	Negativo

Tabla 4.13. Resumen de las mutaciones detectadas en los individuos con indicación de albinismo ocular revaluados para estudio genético de albinismo oculocutáneo y la segregación familiar de dichas mutaciones, mediante secuenciación Sanger del gen TYR y de los exones 6, 7 y 13 del gen OCA2 y mediante MLPA empleando el kit p235. (+/-) heterocigosis; (++) homocigosis.

El albinismo ocular se puede confundir con otras anomalías oculares como Nistagmo ligado al X, acromatopsia, etc por ello, es necesario un adecuado análisis oftalmológico en individuos con baja agudeza visual, percepción tridimensional afectada y visión nocturna alterada para poder realizar el diagnóstico diferencial. Los pacientes masculinos con nistagmo congénito pueden ser candidatos para estudio de albinismo ocular ligado al X, pero el examen oftalmológico, la herencia del carácter, y la presencia o ausencia de otras manifestaciones clínicas pueden guiar el diagnóstico hacia otra condición genética (Preising *et al.*, 2011).

En general, la mayoría de las personas con albinismo oculocutáneo y sobre todo en los casos con albinismo ocular no están diagnosticadas, dado que en los servicios de genética de los hospitales nacionales, no se puede ofertar económicamente el estudio de todos los genes asociados a Albinismo, además de la falta de hospitales de referencia que ayuden al diagnóstico diferencial con otras retinopatías. Si se diagnostican se puede establecer cuidados paliativos específicos que mejoren la calidad de vida de los individuos afectados, poder ofrecer un adecuado consejo genético y poder optar por las nuevas estrategias terapéuticas anteriormente comentadas para el albinismo oculocutáneo. Ya que el mayor defecto discapacitante en todos los tipos de albinismo son los defectos visuales, en el caso de que se confirme que L-Dopa sea realmente el ligando del receptor GPR143, se podrían establecer nuevos conocimientos en este sentido y optar por nuevas estrategias en esta línea.

4.2.7 AXENFELD RIEGER

El síndrome de Axenfeld-Rieger es una patología clínicamente heterogénea de baja prevalencia, que se diagnostica principalmente mediante exámenes oftalmológicos, apoyados por los hallazgos clínicos sistémicos. Esta manifestación fenotípica se ha asociado al menos a dos genes: *PITX2* y *FOXC1*. Las mutaciones en el gen *PITX2* se suelen identificar en pacientes que manifiestan, además de los defectos oculares, alteraciones sistémicas. Sin embargo, las mutaciones en *FOXC1* se asocian más a las formas aisladas del síndrome de Axenfeld Rieger donde solo se dan manifestaciones oculares (Tümer & Bach-Holm, 2009).

Aunque, no existe una clara correlación entre la localización de la mutación en el gen asociado y la severidad de la enfermedad, se ha descrito que aquellos pacientes que presentan mutaciones en el gen *FOXC1* presentan un menor riesgo de desarrollar glaucoma, que aquellos pacientes que presentan mutaciones en el gen *PITX2* (Strungaru *et al.*, 2007).

Las familias **ANF-56**, **ANF-57**, **Varios-238** y **Varios-350** fueron diagnosticados clínicamente como síndrome de Axenfeld-Rieger. El caso índice de las familia ANF-56 presentó características que afectaban a otros sistemas aparte del ocular, mientras que los individuos afectados de las tres últimas familias, presentaron la forma aislada de ARS.

Como el gen *PITX2* está asociado a la forma sistémica del síndrome de Axenfeld Rieger, y dado que la mayoría de las mutaciones en el gen *PITX2* afectan a los exones 5 y 6, se secuenciaron estos dos exones de este gen en la muestra 10/0814 correspondiente al individuo II:1 de la familia **ANF-56**. Se identificó la mutación p.Gln95Pro (c.[287A>C(+)]288G>C) en el exón 5 del gen *PITX2* en el paciente 10/0814. Esta mutación consiste en un doble cambio en heterocigosis en el codon 95 de la proteína, donde el codon CAG (glutamina) cambia a CCC (prolina) (*figura 4.71*). Este cambio no estaba presente en los progenitores, por lo que se asumió, siguiendo el principio de parsimonia, que al ser dos substituciones contiguas es más probable que el error hubiese ocurrido en el mismo cromosoma (cis), en vez de la misma substitución en el mismo lugar en dos cromosomas diferentes (trans).

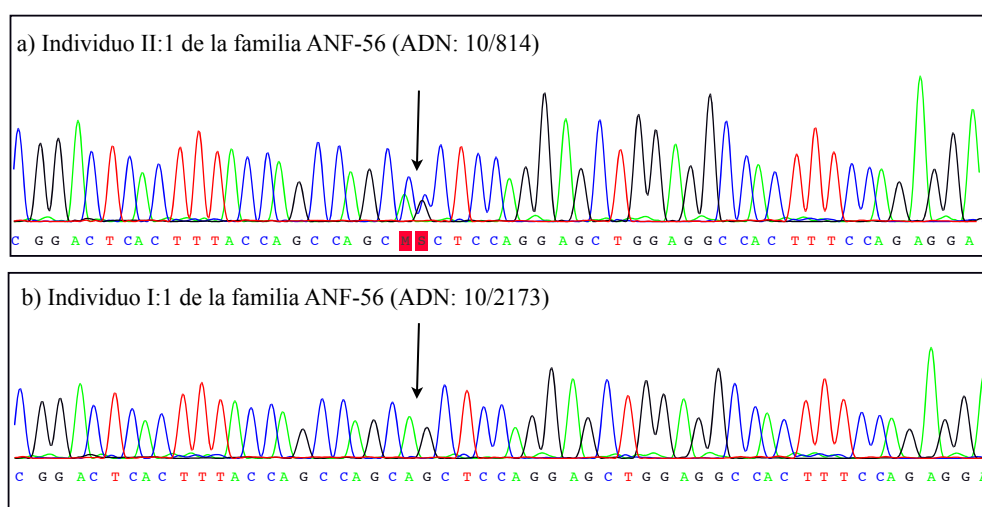


Figura 4.71. Electroferograma del exón 5 del gen *PITX2*: a) en la muestra 10/0814 perteneciente al individuo II:1 de la familia ANF-56, indicando con una flecha el cambio (c.[287A>C(+)]288G>C) y b) en el individuo I:1 correspondiente al padre del caso índice en el que se indica la ausencia de ambos cambios.

Esta variante no había sido descrita con anterioridad, por lo que se realizó el estudio de ésta, en 100 cromosomas de una población control de procedencia española y sana. La ausencia de esta variante en los 100 cromosomas de población española sana, junto con que este aminoácido silvestre se encuentra conservado a lo largo de la evolución (*figura 4.72.*) y la predicción realizada mediante la herramienta bioinformática Polyphen que sugería que esta mutación era patogénica con un valor de 0.99, se determinó la patogenecidad del cambio p.Gln95Pro. La proteína PITX2, que se expresa durante el desarrollo ocular, contiene 5 regiones dominio: 2 dominio de activación (AD) un homeodominio (HD) y dos dominios inhibidores (ID) (Footz *et al.*, 2009). La mayoría de mutaciones detectadas en el gen *PITX2* (45%) son sustituciones de un aminoácido por otro y un 62% de éstas se encuentran localizadas en el homeodominio, como ocurre con la mutación p.Gln95Pro. Esta mutación, podría afectar a la capacidad de unión del homeodominio a ADN, como ocurre con otros cambios que se han descrito en esta misma región (Footz *et al.*, 2009). Sin embargo, sería necesario realizar estudios funcionales para determinar definitivamente el alcance de dicho cambio en la proteína.

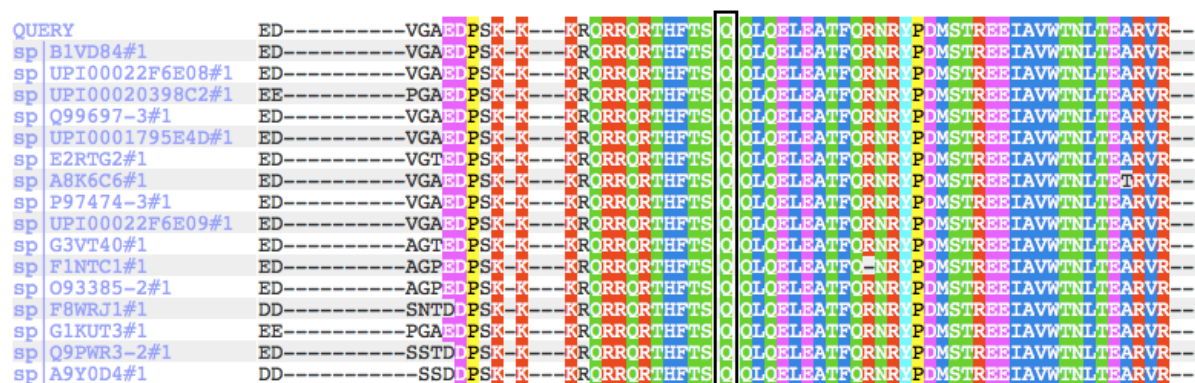


Figura 4.72. Alineamiento múltiple de la secuencia proteica PITX2, marcando la conservación interespecífica del codon 95 de la secuencia humana (Query) comparada con la de distintas especies.

Atendiendo a los datos clínicos en el resto de las familias, y siguiendo el flujograma establecido, por Tümer y colaboradores en 2009, como la mejor estrategia con los mejores nivel de coste-efectividad para aquellos pacientes con ARS, se estudió en primer lugar el gen *FOXC1* (Tümer & Bach-Holm, 2009).

En las muestras analizadas correspondientes a los individuos 10/1995 de la familia ANF-57, 07/0764 de **Varios 238** y 08/1371 de **Varios 350**, se detectó una inserción CGG en la posición 447 de la proteína FOXC1 (*figura 4.73.*). Este cambio fue detectado tanto en los tres pacientes mediante secuenciación Sanger como en individuos de la población control analizados mediante análisis de fragmentos empleando el cebador FOXC1-ex1d-6FAM. La detección de la inserción GGC447ins tanto en pacientes como en individuos control sugiere que esta variante podría tratarse de un polimorfismo. En el análisis de esta variante en la población control del presente estudio se detectó la existencia de dos alelos en el codon 447: el alelo mayoritario (A) con un tamaño correspondiente a 497 pb en un 73% de la población y el alelo minoritario (a) con un tamaño de 500 pb correspondientes en un 27% (*figura 4.74.*). Estos datos fueron muy similares a los previamente publicados por Mears y colaboradores en 1998: (77% y 23% respectivamente) llegando a la misma conclusión para esta variante que en el presente estudio.(Mears *et al.*, 1998).

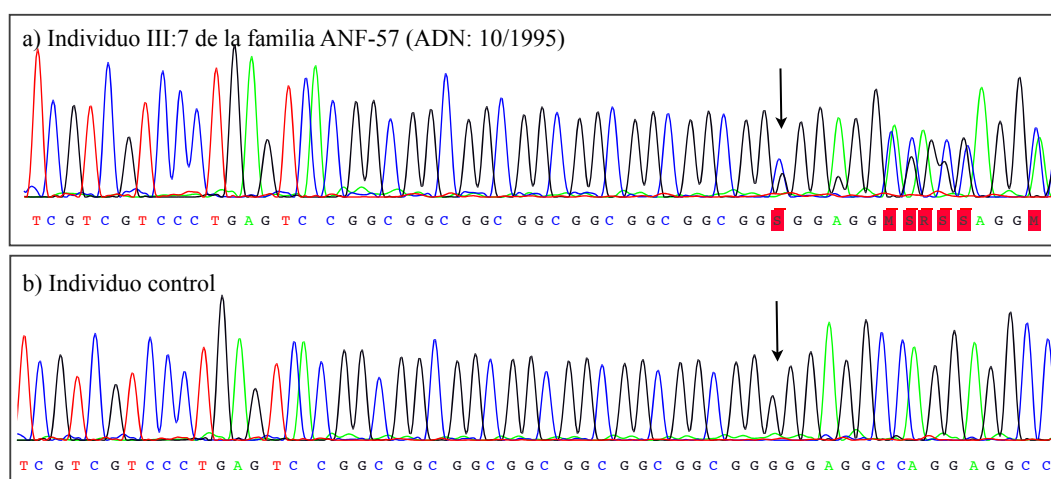


Figura 4.73. Electroferogramas del exón 1 del gen FOXC1 correspondiente a: a) la muestra 10/1995 del individuo III:7 de la familia ANF-57, en la que se señala la presencia de la inserción GGC447ins; b) muestra de un individuo de población sin la inserción GGC447ins.

Alelos (A/a): 497pb/500pb	AA	Aa	aa	Totales
Individuos observados	26	20	3	49
Frecuencias alélica p (A)	$p = A = (2 \cdot 26 + 20 / 2 \cdot 49) = 0,73$			
Frecuencias alélica q (a)	$q = a = (2 \cdot 3 + 20 / 2 \cdot 49) = 0,27.$			

Figura 4.74. Cálculo de las frecuencias alélicas de la variante GGC447ins correspondiente a un amplicón de 500 pb (alelo a) y la variante sin la inserción con un amplicón de 497 pb (alelo A).

A fin de determinar si existían deleciones o duplicaciones en los genes *FOXC1* o *PITX2* se analizaron las muestras mediante la técnica MLPA empleando el kit p054, sin embargo, no se descartaron deleciones ni duplicaciones en ninguna de las regiones que contiene dicho kit (*ver ANEXO III*). Posteriormente, se estudiaron los exones 5 y 6 del gen *PITX2* en dichos pacientes, pero no se detectaron cambios patológicos.

Estas familias también fueron estudiadas mediante un kit casero para descartar deleciones o duplicaciones en el gen *BMP4*, diseñado en un principio para el análisis de pacientes con microftalmia o anoftalmia, ya que ciertas mutaciones se han asociado a Axenfeld Rieger entre otras anomalías oculares (Slavotinek, 2011). Sin embargo, en este estudio tampoco se detectaron deleciones o duplicaciones en este gen.

Aunque no se identificó la causa genética de la patología en las familias Varios 238, ANF-56 y ANF-57, no se descarta que pudieran presentar mutaciones en el resto de los exones del gen *PITX2* o en la regiones reguladoras de los genes *FOXC1* y *PITX2*. Por otro lado, solo al 40% de los pacientes diagnosticados con ARS se les identifica la mutación causante de la patología, por lo que el 60% de los pacientes la causa de la manifestación clínica es desconocida (Hjalt & Semina, 2005), sugiriendo que otros genes aún no caracterizados, pueden estar involucrados en la manifestación fenotípica.

Aunque el número de individuos analizados en este estudio no es suficiente para determinar la idoneidad del diagrama de flujo establecido por Tümer y colaboradores, siguiendo esta estrategia se ha podido caracterizar a 1 familia de las 4 analizadas en este estudio con un ratio coste-efectividad relativamente alto (Tümer & Bach-Holm, 2009). Sin embargo, a continuación, se propone una ligera modificación de lo establecido anteriormente por estos autores y seguida en este estudio como el análisis de cariotipo tras MLPA p054, por si pudiera existir una alteración cromosómica u otras alteraciones en *FOXC1* que pudieran explicar el fenotipo, antes de continuar con el gen *PITX2* por completo, empezando el análisis de este último siempre por los exones 5 y 6 y continuando por el resto (*figura 4.75*).

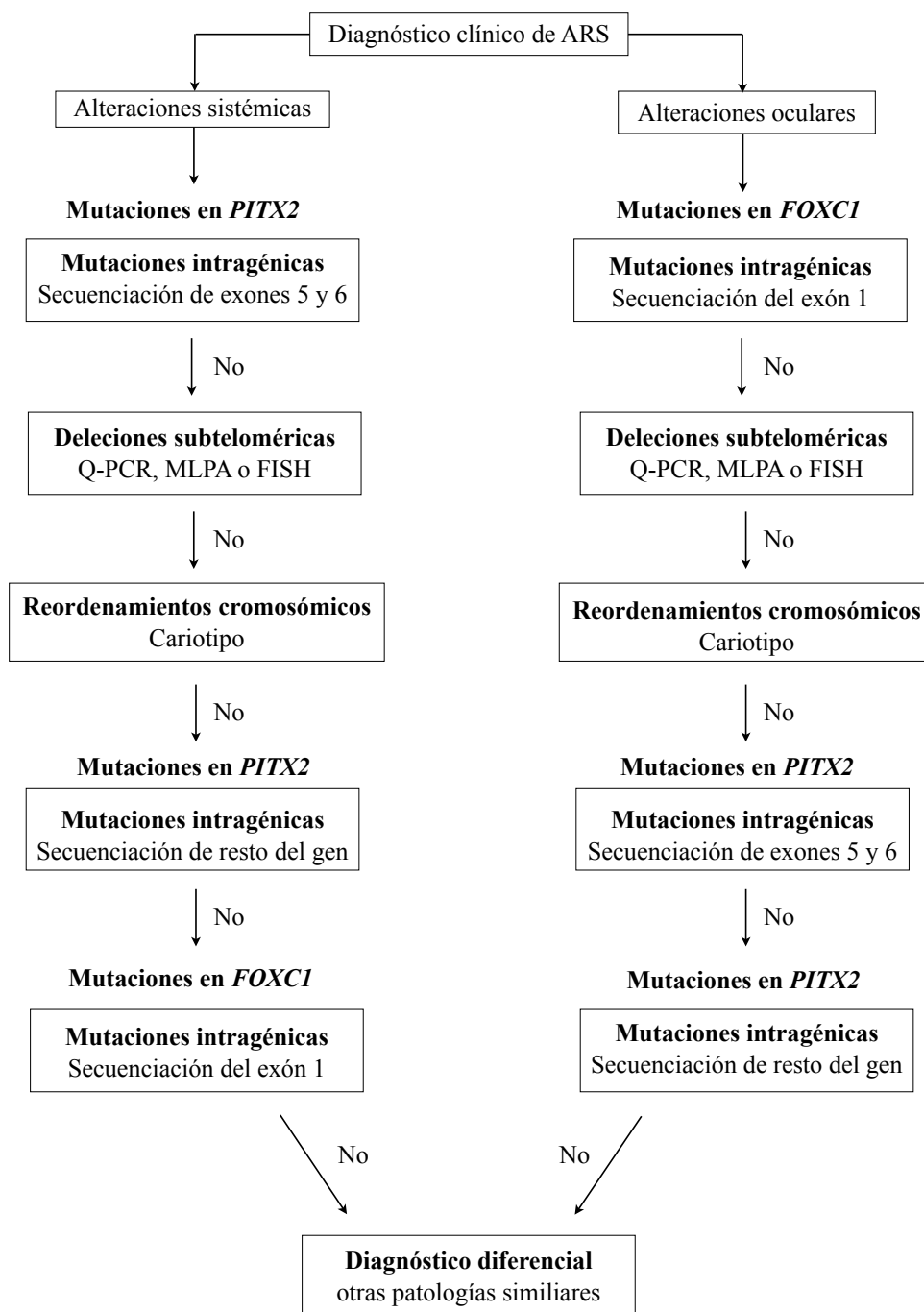


Figura 4.75. Diagrama de flujo para el estudio molecular de pacientes con diagnóstico clínico de Axenfeld Rieger. Modificado de Tumer et al., 2009.

4.3 ORIENTACIÓN CLÍNICA Y ABORDAJE MULTIDISCIPLINAR: CONSEJO GENÉTICO

Ante la presencia de un defecto congénito ya sea en el *probandus*, en los familiares, en el feto o en los mortinatos suelen surgir numerosas inquietudes en el paciente que le suelen provocar miedo, estrés y/o ansiedad emocional. Ante esta perspectiva, las cuestiones más habituales formuladas por el paciente en la consulta de genética se centran básicamente en averiguar los siguientes aspectos:

- la causa de la manifestación clínica
- las implicaciones familiares
- el riesgo de padecer, transmitir o de recurrencia del defecto congénito
- las opciones reproductivas que presentan en cada caso
- los tratamientos disponibles

En los diferentes casos de este estudio que acudieron a consulta de genética, se recogió la historia clínica, se construyó el árbol genealógico, se obtuvieron las muestras requeridas, se realizaron los cálculos de riesgo precisos y se transmitió la información referente a cada patología: síntomas, pronóstico etc., así como la solicitud de las pruebas requeridas para la confirmación de la sospecha clínica y se ofrecieron las opciones terapéuticas, tratamientos u opciones reproductivas disponibles en cada caso, aportando las ventajas e inconvenientes en cada situación en particular.

Esta comunicación clínico-paciente se realizó en un ambiente cómodo para la adecuada interacción y se ofreció la información de forma no directiva, de tal manera que el paciente pudiera tomar sus propias decisiones dentro de un marco ético-legal y en base a su contexto socio-cultural y económico, manteniendo así, los principios de autonomía, beneficencia y no maleficiencia del paciente.

4.3.1 Aspectos comunicativos

La efectiva comunicación clínico-paciente ha sido sujeto de numerosas discusiones y uno de los objetivos principales a alcanzar por los profesionales (Lanie *et al.*, 2004).

En general, se conoce que una **comunicación efectiva** proporciona al paciente una mayor satisfacción, una mayor confianza en el profesional además de una disminución de la ansiedad generada por la incertidumbre de no conocer la causa de su malestar y mejores respuestas a tratamiento (Kim *et al.*, 1989).

Asimismo, una **comunicación pobre o inadecuada** genera mayores costes hospitalarios provocando la búsqueda de segundas opiniones, lo que genera un sufrimiento innecesario, miedo o ansiedad adicional (Leppik, 1990), como ocurrió en el caso previamente expuesto con diagnóstico de displasia oculodentodigital. En ocasiones, estas emociones conllevan a los pacientes, a una búsqueda de información en otras fuentes no fiables como páginas web de contenido científico no contrastado con la literatura, que les proporcionan mayor confusión y/o perturbación e incluso a la búsqueda de tratamientos clínicamente no validados.

La buena interacción clínico-paciente depende de las aptitudes primordiales de las dos partes:

-En el **paciente**, el estrés emocional puede afectar a la comprensión de aspectos ya complejos *per sé*. Otra de las dificultades atribuidas a la deficiencia de la comunicación hacen referencia al nivel educacional y a las diferencias culturales y lingüísticas del paciente (Rosas-Blum *et al.*, 2007).

A lo largo de la investigación de la presente tesis, al haber analizado a pacientes de diversas nacionalidades y culturas, se ha observado que la transmisión de la información a un paciente con un idioma diferente al clínico que les atiende, puede verse afectada cuando dicha información es traducida por un familiar y no por el profesional o un traductor entrenado. De esta forma, no se garantiza que la información llegue adecuadamente y se corre el riesgo de que se lleguen a conclusiones erróneas por diferencias en la traducción. Por lo tanto, la transmisión de la información se debería realizar en la primera lengua del paciente o bien, por traductores con conocimientos de la terminología manejada. En los aspectos culturales se ha observado que pueden influir desde el concepto de riesgo, hasta la toma de decisiones en cuanto a las medidas terapéuticas y paliativas a decidir. Esto se vio reflejado durante la consulta con los progenitores del feto con condrodisplasia tipo Grebe.

-En el **profesional**: el empleo excesivo de lenguaje técnico sin aclaraciones, el tiempo insuficiente concedido a la atención del paciente por las exigencias asistenciales, o la falta de entrenamiento de éste para realizar una comunicación efectiva de la información y la cronología de la naturaleza de las noticias emitidas, puede afectar a la comprensión (Rosas-Blum *et al.*, 2007).

En esta parte, se simplificó la terminología garantizando la comprensión de la misma y se ofrecieron copias de la información para que los pacientes tuvieran la oportunidad de aclarar las dudas en futuras consultas.

4.3.2 Aspectos en la recogida de la información clínica

La recogida de la información clínica es crucial para la realización de genéticas posteriores. Es necesario adjuntar las pruebas iniciales a los siguientes análisis, para que desde el principio hasta el fin se considere toda la información obtenida en cada caso, para finalmente realizar un adecuado manejo de los pacientes. La posibilidad de poder confirmar el diagnóstico clínico mediante el análisis genético es de crucial importancia, en cuanto al manejo clínico de los pacientes afectados y de sus familiares, al permitir identificar a individuos de la familia en riesgo de padecer la patología familiar.

En la recogida de material clínico, se debe realizar una exhaustiva evaluación, anotando las características relevantes de las manifestaciones y la sospecha clínica, así como posibles diagnósticos diferenciales.

En las malformaciones congénitas, objeto de la presente tesis, se apreció la importancia de conocer el tipo de alteración, y el momento del embarazo en el que se pudo originar el defecto para poder identificar así, las posibles causas del defecto. Conocer las causas permite averiguar si existe riesgo de recurrencia y así poder prevenir, paliar o tratar la enfermedad, estableciendo de esta manera, las bases de un adecuado consejo genético.

Asimismo, en el período de investigación se ha observado que cuando los pacientes son derivados por otro especialista de otro centro, o bien en el caso de restos abortivos, la información clínica de los casos son escasas, proporcionando en muchas ocasiones únicamente la sospecha diagnóstica. No obstante, se ha demostrado en la presente tesis que la realización de pruebas genéticas con exclusivamente la sospecha clínica puede ser tedioso e infructuoso, pero que la interacción multidisciplinar, la proporción de detalles clínicos al genetista-molecular y la revaluación de los casos, puede proporcionar una caracterización genética más dirigida, llegando al diagnóstico final con mayor eficiencia, optimizando de esta manera, los recursos disponibles en cada caso (Peraíta-Ezcurra *et al.*, 2012).

4.3.3 Aspectos de la recogida de las muestras biológicas

En este estudio, en la recogida y almacenamientos de las muestras biológicas, se han seguido los procedimientos establecidos por los aspectos legales de la ley española. Se han obtenido numerosas muestras de diversa índole: sangre periférica, tejido muscular fresco y parafinado, saliva, linfocitos etc. La obtención de la cantidad y calidad del ADN es dependiente del número de células nucleadas y la conservación de la muestra de partida y por tanto, influyen en los resultados de las pruebas genéticas ADN-dependientes. Algunas técnicas moleculares tienen mayores requisitos que otras en cuanto a la calidad de ADN.

En este estudio, las muestras de ADN de los restos abortivos presentaron menor calidad que la muestras procedentes de saliva o sangre periférica. La elevada maceración de algunos restos abortivos así como la conservación de algunas de las muestras con agentes dañinos como el formol, afectaron a la calidad de ADN, viéndose afectados los resultados de las técnicas de MLPA y array CGH.

4.3.4 Opciones terapéuticas o reproductivas

En los posibles tratamientos de los pacientes con defectos congénitos es necesario, en primer lugar, determinar la confirmación de la sospecha clínica inicial mediante los análisis moleculares. La correlación genotipo-fenotipo permite en ocasiones determinar el pronóstico de la enfermedad y las características fenotípicas del pacientes entre otras, lo que facilita un seguimiento del paciente más adecuado en función de la alteración genética.

Esta correlación genotipo-fenotipo, en ocasiones permite la investigación de nuevas terapias génicas. En este trabajo se realizó la correlación genotipo-fenotipo en los casos caracterizados, pudiendo en algún caso, beneficiarse de diversas opciones.

En el caso del síndrome de Marfan, el poder determinar si un determinado paciente puede tener exclusivamente síndrome de Ectopia Lentis o por el contrario tener aneurisma cardíaca, puede ser decisivo para el tratamiento farmacológico actual o para los futuros tratamientos con Losartan. En el caso del Albinismo Oculocutáneo, la determinación del subtipo clínico permite establecer las nuevas dianas terapéuticas actualmente en investigación, como la administración de Nitisinona a los individuos con tirosinasa residual.

En todas y cada una de las patologías analizadas en el presente estudio, el hecho de conocer la causa genética de la manifestación fenotípica, les permitía a las futuras gestantes optar a diferentes opciones reproductivas como el diagnóstico prenatal, el diagnóstico genético preimplantacional, donación de gametos y la adopción.

Normalmente, las opciones que los pacientes eligen en primer lugar, son las que les permita poder contribuir de alguna manera, con su material genético a su futuro descendiente, por lo que las dos primeras opciones son las más elegidas. Estas dos formas requieren el conocimiento de la determinación de la/s mutación/es causal/es. De todas formas, el contexto cultural también puede influir en la decisión desde el inicio de la concepción hasta la decisión de continuar o interrumpir un embarazo de un feto con defectos congénitos, como ocurrió en el caso de la condrodisplasia tipo Grebe.

En ocasiones, aunque los pacientes acuden a consulta con una idea preconcebida de opción reproductiva, el conocimiento de la existencia de diversas posibilidades y la comunicación de las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas, les puede llevar a la toma de decisión de una opción diferente a la inicial, como sucedió en el caso de la displasia oculodentodigital presentada en este estudio, que en primer lugar acudió con la indicación de diagnóstico genético preimplantacional y tras conocer y comprender todas las opciones así como los pros y contras de cada opción, se inclinaron por el embarazo espontáneo y posterior diagnóstico genético prenatal.

Otra de las opciones que está tomando mayor participación gracias a los estudios validados, son las técnicas no invasivas como el diagnóstico genético no invasivo. Esta técnica se puso a punto para la detección de la mutación de la displasia oculodentodigital del caso analizado en este trabajo de investigación. Otra de las aplicaciones de esta técnica además de la detección de mutaciones de origen paterno, es la determinación de sexo fetal, de la que se pudieron beneficiar tres parejas, donde en los tres casos se trataban de mujeres portadoras de ocular ligado al X. Al no amplificarse el cromosoma Y en los fetos de estas tres gestantes, no fue necesario realizar las técnicas invasivas, por lo que se evitó el riesgo de pérdida fetal.

En este estudio, varias parejas optaron por el diagnóstico genético preimplantacional, como las tres parejas que pertenecieron a las familias de Marfan. Aunque ninguna de las tres gestantes de estas familias se quedó embarazada, hay que tener en cuenta que el porcentaje de esta técnica es muy baja y requiere un tratamiento farmacológico muy riguroso. Además, a esta opción recurren mujeres que tienen una edad superior al periodo óptimo biológico de reproducción.

Un correcto manejo genético-clínico de los pacientes permite la caracterización de los mismos así como la adopción de pautas para ofrecer un adecuado consejo genético.

4.4 EPÍLOGO

El interés del hombre por las enfermedades, en el periodo anterior a la transición epidemiológica del siglo XVIII en los países desarrollados de Europa, se centraba en atender principalmente, los problemas derivados de las enfermedades más prevalentes y aquellas que generan una mayor morbilidad y mortalidad, debido a motivos socioeconómicos. Sin embargo, con la consolidación del Estado de Bienestar y el progresivo aumento de la esperanza de vida ha adquirido mayor relevancia, en los países occidentales, el estudio de enfermedades crónicas con frecuencia invalidantes o con una mortalidad precoz, debido al elevado coste social y sanitario que suponen (Avellaneda *et al.*, 2007).

En este marco socio-sanitario se hallan las enfermedades raras cuyo término acuñado en base a su prevalencia, no refleja la gravedad o discapacidad de la misma y además, varía según el país. Así, en Europa la cifra es de 5 por cada 10.000 habitantes, en Japón de 4 por cada 10.000 y en EEUU es menos de 7,5 por cada 10.000 habitantes (Torrent-Farnell & Morros, 2001).

El conocimiento genético de la etiopatogenia de las enfermedades hereditarias se ha ido incrementando sustancial y exponencialmente, desde los primeros conocimientos derivados de los trabajos de Mendel sobre la herencia de caracteres. En aquella época, no se podía vislumbrar la trascendencia de estas teorías, que sentarían las bases de los conceptos básicos de la genética actual. Gracias a estos descubrimientos, se derivaron numerosos estudios que permitieron comprender aspectos aún más complejos, en distintos campos de la biología y con distintas aplicaciones desde mejora hasta conservación de especies, mediante estudios de genética de poblaciones. Hasta que finalmente, se pudieron aplicar estos conocimientos a la especie humana extrapolando los conocimientos obtenidos del estudio de especies emparentadas y de proteínas conservadas a lo largo de la evolución, lo que revela cómo dos disciplinas aparentemente no relacionadas, tales como las teorías evolutivas de Darwin y las teorías de Mendel, convergen creando un efecto sinérgico en el avance del entendimiento.

Otros de los puntos de inflexión importante en este aspecto fue el descifrado de la secuencia genética de diferentes especies y sobre todo, el Proyecto Genoma Humano que ha permitido tener acceso a la secuencia completa genómica humana y generar bases de datos con acceso universal a esta información, gracias asimismo, al avance informático de los últimas décadas. A partir de aquí, mensualmente se han ido generando infinidad de estudios en los diferentes campos desde la investigación básica hasta la clínica y el acceso a dicha información ha permitido el desarrollo de nuevas investigaciones y nuevas hipótesis apoyando el estudio de unos investigadores a otros y desarrollando entre todos, el estado actual de la genética.

Gracias a los avances científicos que se han produciendo a lo largo de las ultimas décadas, se han comenzado a comprender las causas por las que se producen las anomalías del desarrollo embrionario y fetal, aunque sólo se consiguen identificar en un 40-50% de los pacientes. El 60% de los defectos congénitos se desconoce aún, el agente determinante aunque se sospecha que pueden estar inducidas por factores ambientales (Eurocat central Registry, 2004).

El hecho de que la mayoría de los defectos congénitos sean de causa desconocida, dificulta la adopción de medidas preventivas o terapéuticas. Este trabajo se desarrolló con la idea de contribuir en el avance del conocimiento de las malformaciones congénitas relacionada con anomalías de baja prevalencia, ya que los defectos congénitos son la primera causa de muerte perinatal. La aparición de defectos congénitos, detectados tanto prenatal como postnatalmente, producen una gran ansiedad en la familia y una enorme demanda asistencial, que requiere de la cooperación multidisciplinar entre los diferentes profesionales experimentados (Marugan & Sangrador, 2006).

4.4.1 FUTURAS DIRECCIONES

Los avances tecnológicos de los últimos tiempos, permitirán que se siga avanzando en el entendimiento y por tanto, en la explicación biológica de las enfermedades hereditarias.

En el campo del **diagnóstico clínico** se aunarán esfuerzos desde un punto de vista multidisciplinar para seguir diagnosticando, con mayor precocidad, los defectos congénitos tanto en periodo prenatal como postnatal. Además, los estudios prenatales vendrán acompañados de las nuevas aplicaciones de las técnicas de diagnóstico genético no invasivo como la detección de cromosomopatías en el ADN fetal a partir de plasma materno, permitiendo así disminuir los riesgos de pérdida fetal asociadas a las técnicas invasivas.

En el campo del **diagnóstico molecular** de fetos, restos abortivos, o individuos adultos con defectos congénitos tendrán mayor implicación en el diagnóstico de rutina, las plataformas genómicas o exómicas: microarrays y secuenciación exómica o genómica.

En concreto, el impulso del empleo de los SNP arrays para la búsqueda de genes candidatos a analizar, en el caso de fetos con malformaciones congénitas, puede resultar muy útil, porque al determinar el genotipo global de una serie de marcadores detectando la presencia o ausencia de un conjunto de SNPs en la muestra problema, presenta ventajas añadidas a los microarrays de oligonucleótidos como 1) identificar el origen parental de cada copia, 2) detectar disomías uniparentales o pérdidas de heterocigosidad (LOH), siendo éstas últimas (LOH) indicativas de deleciones o regiones de homocigosidad candidatas de genes recesivos. En cuanto a las plataformas exómicas o genómicas, la interpretación de las variantes de significado incierto, así como el establecimiento de los marcos éticos-legales de la información adquirida de hallazgos añadidos no esperados, serán otras de las direcciones importantes a seguir en este campo, para mejorar la comunicación genetista-paciente ante dichos hallazgos.

Estos estudios junto con los trabajos derivados del proyecto ENCODE posiblemente ayudarán a resolver parte del enigma existente en la heterogeneidad clínica de los pacientes analizando las regiones reguladoras de los genes y permitirá identificar la funcionalidad de nuevos genes.

Otras de las futuras direcciones será el empleo de modelos animales de experimentación para las enfermedades mendelianas de baja prevalencia, para el hallazgo de nuevas dianas terapéuticas.

Finalmente, el reconocimiento de la figura del especialista en genética clínica en España facilitará el establecimiento de las bases que permitan una mejor atención al paciente con una enfermedad o defecto congénito de base genética.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS DE LOS DEFECTOS CONGÉNITOS EN ABORTOS

1.1 El registro ecográfico, fotográfico, radiológico y/o anatomopatológico en abortos con defectos congénitos supone un requerimiento indispensable para el diseño de estudios posteriores de una forma dirigida y eficiente, optimizando así los recursos disponibles.

1.2 Previamente al análisis citogenético y/o molecular, es necesaria la evaluación clínica exhaustiva en abortos de segundo trimestre de gestación diferidos con malformaciones congénitas, para poder dirigir su estudio. En el caso de que haya sospecha de un determinado síndrome, se recomienda la confirmación diagnóstica de éste en primer lugar.

1.3 Se propone el cariotipo como primera opción, para el estudio de abortos de primer trimestre de gestación, independientemente de la sospecha clínica inicial, debido a la mayor implicación de poliploidías en éstos.

1.4 Se propone el cariotipo como segunda opción tras el estudio mediante arrays, en abortos de segundo trimestre de gestación, para el descarte de la poliploidías.

1.5 Se recomienda la obtención de muestras de las diferentes capas embrionarias, ya que puede ser relevante en ciertos casos para dilucidar el diagnóstico definitivo. La falta de disponibilidad de este tipo de muestras, no permite discernir si las cromosomopatías detectadas son completas o en mosaico, como en los casos con trisomías 15 y 9 de este estudio.

1.6 El cribado de genes que intervienen en el desarrollo embrionario tales como *PTPN11*, *TBX1*, *TBX5* y *SHH*, no ha sido concluyente debido a la falta de información clínica detallada inicial, que no ha permitido establecer un diseño molecular específico, dirigido y adecuado, en contraste con los casos que presentaban malformaciones esqueléticas bien definidas clínicamente, como la Osteogénesis Imperfecta (gen *COL1A1*) y el Ellis van Creveld (gen *EVC2*).

1.7 Las mutaciones puntuales en genes concretos y la presencia de CNVs en abortos con defectos congénitos mayoritariamente de segundo trimestre, podrían tener mayor implicación de la conocida en la actualidad, una ampliación del estudio en este campo posiblemente podría incrementar la caracterización de los casos con etiología desconocida.

1.8 Para la interpretación de resultados de técnicas de aproximación genómica, como array CGH, resulta esencial la obtención de muestras no solo del caso índice sino también de los progenitores, ya que ayuda a dilucidar la implicación patológica de las variantes encontradas.

1.9 La información clínica paterna, habitualmente ausente, constituye un elemento de interés en la caracterización en algunos abortos, debido a la correlación en algunas patologías entre mutaciones de *novo* y la edad paterna avanzada en el momento de la gestación.

1.10 El diseño del algoritmo de actuación así como el modelo de historia clínica, propuestos en este estudio para restos abortivos, son una herramienta útil para el manejo genético-clínico de los restos abortivos que presentan defectos congénitos.

1.11 Sería recomendable crear en los hospitales Unidades de Coordinación de estudio de abortos, en los que intervengan los Servicios de Ginecología-Obstetricia, Genética, Radiología, y Anatomía Patológica, para el adecuado manejo genético-clínico tanto de los fetos como de sus progenitores, con la finalidad de que éstos últimos puedan recibir el adecuado consejo genético.

2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS DE DEFECTOS CONGÉNITOS EN PACIENTES QUE PRESENTAN SÍNDROMES RECONOCIBLES

2.1 El ajuste de criterios clínicos estrictos junto con el diseño de algoritmos diagnósticos dirigidos es esencial para la caracterización de pacientes con patologías como síndrome de delección 22q11.2, síndrome de Holt-Oram, Albinismo y Axenfeld Rieger.

2.2 Es recomendable realizar el diagnóstico diferencial en los individuos con cardiopatía conotruncal referidos para estudio de síndrome de microdeleción 22q11.2 que no presentan deleción, antes de iniciar la búsqueda de mutaciones en el gen *TBX1* u otros genes candidatos presentes en ésta región cromosómica, ya que los resultados pueden ser infructuosos.

2.3 El resultado de una duplicación de la región intrónica del gen *TBX5* (*intrón 7*) detectada mediante array CGH en uno de los pacientes con síndrome de Holt Oram y la elevada tasa de detección de una única mutación en los genes asociados a Albinismo Oculocutáneo, sugiere la posible implicación de regiones reguladoras como mecanismo patológico en ambos casos.

2.4 En el estudio del Albinismo Oculocutáneo se recomienda incrementar los estudios de haplotipos que permitan concluir la existencia de otro tipo de mecanismos mutacionales en los aledaños de la zona codificante del gen *TYR*.

2.5 Es necesario establecer criterios clínicos para el diagnóstico de Albinismo, sobre todo en población europea, para dirigir la búsqueda de mutaciones en los genes candidatos. Una buena caracterización del grado preciso de pigmentación de los individuos con albinismo oculocutáneo, permitiría discernir entre los subtipos del mismo, evitando la actual subjetividad de la descripción clínica del color de pelo y piel en ellos.

2.6 El poder confirmar genéticamente la sospecha clínica de una determinada patología, permite a los pacientes beneficiarse de estrategias terapéuticas innovadoras que se encuentran actualmente en desarrollo como las existentes para el Síndrome de Marfan y el Albinismo.

2.7 Los valores morales y ético-culturales pueden influir en las decisiones referentes a las implicaciones genéticas. Es importante la comprensión de lo que implica ser portador de una enfermedad genética recesiva, como el síndrome de Grebe, en un entorno cultural distinto y con elevada tendencia a la consanguinidad.

2.8 Transmitir toda la información al paciente para dar un adecuado consejo genético de forma no directiva, mantiene el principio de autonomía, beneficiencia y no maleficiencia, permitiendo al paciente poder tomar sus propias decisiones, e incluso cambiar las ideas preconcebidas, como en la pareja afectada por displasia oculodentodigital.

3. CONCLUSIONES GENERALES DE LOS DEFECTOS CONGÉNITOS

3.1 La correcta determinación y clasificación clínica del tipo de defecto genético permite definir la estrategia del estudio citogenética y/o molecular en cada caso en particular.

3.2 La aproximación multidisciplinar es fundamental para el adecuado abordaje de las patologías hereditarias, proporcionando un nuevo enfoque de tal manera que permite establecer las estrategias de análisis, facilitando así el mejor entendimiento de las mismas.

3.3 Diagnosticar genéticamente una determinada patología permite a los pacientes beneficiarse de las diferentes opciones reproductivas, tales como el diagnóstico genético prenatal convencional, el diagnóstico genético prenatal no invasivo y el diagnóstico genético preimplantacional, alternativas a la donación de gametos o a la adopción.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFIA

A

- Adinolfi, M. M., Pertl, B. B., & Sherlock, J. J. (1997). Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenatal Diagnosis*, 17(13), 1299–1311.
- Adinolfi, M., & Sherlock, J. (2001). Prenatal detection of chromosome disorders by QF-PCR. *The Lancet*, 358, 1030-1031.
- Aerts, M., Van Holsbeke, C., de Ravel, T., & Devlieger, R. (2006). Prenatal diagnosis of type II osteogenesis imperfecta, describing a new mutation in the *COL1A1* gene. *Prenatal Diagnosis*, 26(4), 394–394.
- Al-Gazali, L. I. L., Bakir, M. M., Hamid, Z. Z., Varady, E. E., Varghes, M. M., Haas, D. D., et al. (2003). Birth prevalence and pattern of osteochondrodysplasias in an inbred high risk population. *Birth Defects Research Part a: Clinical and Molecular Teratology*, 67(2), 125–132.
- Alanay, Y., Avaygan, H., Camacho, N., Utine, G. E., Boduroglu, K., Aktas, D., et al. (2010). Mutations in the Gene Encoding the RER Protein FKBP65 Cause Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta. *American Journal of Human Genetics*, 86(4), 9–9.
- Allanson, J. E. J. (1986). Noonan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 24(1), 9–13.
- Arbustini E, Grasso M, Ansaldi S, Malattia C, Pilotto A, Porcu E, et al. (2005). Identification of sixty-two novel and twelve known FBN1 mutations in eighty-one unrelated probands with Marfan syndrome and other fibrillinopathies. *Human Mutation*, 26(5):494.
- Avellaneda, A., Izquierdo, M., Torrent-Farnell, J., & Ramón, J. R. (2007). Rare Diseases: chronic diseases that need a new approach. *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*, 30(2), 177–190.
- Aytés, A. P. (2002). Asesoramiento genético en pediatría general. *Pediatr Integral*, 6(9), 809–819.

B

- Bakrania, P., Robinson, D. O., Bunyan, D. J., Salt, A., Martin, A., Crolla, J. A., et al. (2007). *SOX2* anophthalmia syndrome: 12 new cases demonstrating broader phenotype and high frequency of large gene deletions. *The British Journal of Ophthalmology*, 91(11), 1471–1476.
- Baldini, A. A. (2005). Dissecting contiguous gene defects: *TBX1*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(3), 6–6.
- Baldrige, D. D., Schwarze, U. U., Morello, R. R., Lenington, J. J., Bertin, T. K. T., Pace, J. M. J., et al. (2008). CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. *Human Mutation*, 29(12), 1435–1442.
- Barch, M. J., Knutsen, T., Spurbeck, J. L., & Technologists, A. O. G. (1997). *The AGT cytogenetics laboratory manual*. 3ed Lippincott Williams & Wilkins. 666 pp.
- Barford, D. D., & Neel, B. G. B. (1998). Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure*, 6(3), 249–254.
- Basel, D., & Steiner, R. D. (2009). Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genetics in Medicine*, 11(6), 375–385.

- Basit, S., Naqvi, S. K.-U.-H., Wasif, N., Ali, G., Ansar, M., & Ahmad, W. (2008). A novel insertion mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP1) gene underlies Grebe-type chondrodysplasia in a consanguineous Pakistani family. *BMC Medical Genetics*, 9, 102–102.
- Bassett, A. S., Chow, E. W. C., Husted, J., Weksberg, R., Caluseriu, O., Webb, G. D., & Gatzoulis, M. A. (2005). Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 138(4), 307–313.
- Bassi, M. T. M., Schiaffino, M. V. M., Renieri, A. A., De Nigris, F. F., Galli, L. L., Bruttini, M. M., et al. (1995). Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nature Genetics*, 10(1), 13–19.
- Bassi, M. T. M., Bergen, A. A. A., Bitoun, P. P., Charles, S. J. S., Clementi, M. M., Gosselin, R. R., et al. (2001). Diverse prevalence of large deletions within the OA1 gene in ocular albinism type 1 patients from Europe and North America. *Human Genetics*, 108(1), 51–54.
- Basson, C. T. C., Cowley, G. S. G., Solomon, S. D. S., Weissman, B. B., Poznanski, A. K. A., Traill, T. A. T., et al. (1994). The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *New England Journal of Medicine*, 330(13), 885–891.
- Basson, C. T., Bachinsky, D. R., Lin, R. C., Levi, T., Elkins, J. A., Soult, J., et al. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature Genetics*, 15(1), 30–35.
- Baujat, G. G., & Le Merrer, M. M. (2006). Ellis-van Creveld syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2, 27–27.
- Beighton, P. P., de Paepe, A. A., Danks, D. D., Finidori, G. G., Gedde-Dahl, T. T., Goodman, R. R., et al. (1988). International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue, Berlin, 1986. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 29(3), 581–594.
- Belmont, J. W. J. (1998). Recent progress in the molecular genetics of congenital heart defects. *Clinical Genetics*, 54(1), 11–19.
- Bermejo, E. E., & Martínez-Frías, M. L. M. (1998). Congenital eye malformations: clinical-epidemiological analysis of 1,124,654 consecutive births in Spain. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 75(5), 497–504.
- Bermejo Sánchez, E. (2010). Frecuencias de defectos congénitos al nacimiento en España y su comportamiento temporal y por comunidades autónomas. Causas de las variaciones de las frecuencias. *Semergen - Medicina De Familia*, 36(8), 449–455.
- Berry, F. B., Lines, M. A., Oas, J. M., Footz, T., Underhill, D. A., Gage, P. J., & Walter, M. A. (2006). Functional interactions between FOXC1 and PITX2 underlie the sensitivity to FOXC1 gene dose in Axenfeld-Rieger syndrome and anterior segment dysgenesis. *Human Molecular Genetics*, 15(6), 905–919.
- Binder, G. G. (2011). Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Hormone Research in Paediatrics*, 75(2), 81–89.
- Blair, H. J., Thompson, S., Liu, Y.-N., Campbell, J., MacArthur, K., Ponting, C. P., et al. (2011). Evc2 is a positive modulator of Hedgehog signalling that interacts with Evc at the cilia membrane and is also found in the nucleus. *BMC Biology*, 9, 14.
- Boissy, R. E., Zhao, H., Oetting, W. S., Austin, L. M., Wildenberg, S. C., Boissy, Y. L., et al. (1996). Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as "OCA3". *American Journal of Human Genetics*, 58(6), 1145–1156.
- Borozdin, W., Bravo Ferrer Acosta, A. M., Bamshad, M. J., Botzenhart, E. M., Froster, U. G., Lemke, J., et al. (2006). Expanding the spectrum of TBX5 mutations in Holt-Oram syndrome:

- detection of two intragenic deletions by quantitative real time PCR, and report of eight novel point mutations. *Human Mutation*, 27(9), 975–976.
- Botto, L. D. L., May, K. K., Fernhoff, P. M. P., Correa, A. A., Coleman, K. K., Rasmussen, S. A. S., et al. (2003). A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics*, 112(1 Pt 1), 101–107.
- Branicki, W., Brudnik, U., & Wojas-Pelc, A. (2009). Interactions between HERC2, OCA2 and MC1R may influence human pigmentation phenotype. *Annals of Human Genetics*, 73(2), 160–170.
- Brassington, A.-M. E. A., Sung, S. S. S., Toydemir, R. M. R., Le, T. T., Roeder, A. D. A., Rutherford, A. E. A., et al. (2003). Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. *American Journal of Human Genetics*, 73(1), 74–85.
- Bruneau, B. G. B., Nemer, G. G., Schmitt, J. P. J., Charron, F. F., Robitaille, L. L., Caron, S. S., et al. (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*, 106(6), 709–721.
- Bruneau, B. G. (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*, 451(7181), 943–8.
- Bugge, M. M., Collins, A. A., Petersen, M. B. M., Fisher, J. J., Brandt, C. C., Hertz, J. M. J., et al. (1998). Non-disjunction of chromosome 18. *Human Molecular Genetics*, 7(4), 661–669.
- Bustamante-Aragones, A., de Alba, M. R., Gonzalez-Gonzalez, C., Trujillo-Tiebas, M. J., Diego-Alvarez, D., Vallespin, E., et al. (2008). Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the fetuses of female carriers. *Haemophilia*, 14(3), 593–598.
- Byers, P. H., Barsh, G. S., & Holbrook, K. A. (1982). Molecular pathology in inherited disorders of collagen metabolism. *Hum Pathol*, 13(2), 89–95.

C

- Cabral, W. A. W., Milgrom, S. S., Letocha, A. D. A., Moriarty, E. E., & Marini, J. C. J. (2006). Biochemical screening of type I collagen in osteogenesis imperfecta: detection of glycine substitutions in the amino end of the alpha chains requires supplementation by molecular analysis. *Journal of Medical Genetics*, 43(8), 685–690.
- Cabral, W. A. W., Chang, W. W., Barnes, A. M. A., Weis, M. M., Scott, M. A. M., Leikin, S. S., et al. (2007). Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nature Genetics*, 39(3), 359–365.
- Caparros-Martín, J. A., Valencia, M., Reytor, E., Pacheco, M., Fernandez, M., Perez-Aytes, A., et al. (2013). The ciliary Evc/Evc2 complex interacts with Smo and controls Hedgehog pathway activity in chondrocytes by regulating Sufu/Gli3 dissociation and Gli3 trafficking in primary cilia. *Human Molecular Genetics*, 22(1), 124–139.
- Carey, J. C. (2005). Trisomy 18 and trisomy 13 syndromes. *Management of Genetic Syndromes*. doi: 10.1002/0471695998.mgs047
- Cascos, A. S. (1967). Holt-Oram Syndrome. *Acta Paediatrica*, 56(3), 313–317.
- Caspersson, T. T., Zech, L. L., & Johansson, C. C. (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental Cell Research*, 60(3), 315–319.
- Cereda, A., & Carey, J. C. (2012). The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(1), 81–81.
- Chaki, M., Mukhopadhyay, A., & Ray, K. (2005). Determination of variants in the 3'-region of the tyrosinase gene requires locus specific amplification. *Human Mutation*, 26(1), 53–58.

- Chang, S. C., Hoang, B., Thomas, J. T., Vukicevic, S., Luyten, F. P., Ryba, N. J., et al. (1994). Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28227-34.
- Chang, T.-S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440–2475.
- Charles, S. J., Moore, A. T., Grant, J. W., & Yates, J. R. (1992). Genetic counselling in X-linked ocular albinism: clinical features of the carrier state. *Eye (London, England)*, 6 (Pt 1), 75–79.
- Chen, C.-P. (2009). Prenatal sonographic features of fetuses in trisomy 13 pregnancies (II). *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 48(3), 218–224.
- Chiang, P.-W., Spector, E., & Tsai, A. C.-H. (2009). Oculocutaneous albinism spectrum. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149A(7), 1590–1591.
- Chieffo, C. C., Garvey, N. N., Gong, W. W., Roe, B. B., Zhang, G. G., Silver, L. L., et al. (1997). Isolation and Characterization of a Gene from the DiGeorge Chromosomal Region Homologous to the Mouse Tbx1 Gene. *Genomics*, 43(3), 11–11.
- Chintamaneni, C. D., Halaban, R., Kobayashi, Y., Witkop, C. J., & Kwon, B. S. (1991). A single base insertion in the putative transmembrane domain of the tyrosinase gene as a cause for tyrosinase-negative oculocutaneous albinism. *Pnas*, 88(12), 5272–5276.
- Christiansen, H. E., Schwarze, U., Pyott, S. M., AlSwaid, A., Balwi, Al, M., Alrasheed, S., et al. (2010). Homozygosity for a Missense Mutation in SERPINH1, which Encodes the Collagen Chaperone Protein HSP47, Results in Severe Recessive Osteogenesis Imperfecta. *American Journal of Human Genetics*, 86(3), 10–10.
- Cifuentes-Cifuentes, Y., & Arteaga-Díaz, C. (2008). Prevalencia y caracterización de los recién nacidos con anomalías craneofaciales en el Instituto Materno Infantil de Bogotá. *Revista De Salud Pública*, 10(3), 423-432.
- Cockwell, A., MacKenzie, M., & Youings, S. (1991). A cytogenetic and molecular study of a series of 45, X fetuses and their parents. *Journal of Medical Genetics*, 28, 151-155.
- Cohen, M. M. (1989a). Perspectives on holoprosencephaly: Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. *Teratology*, 40(3), 211–235.
- Cohen, M. M. M. (1989b). Perspectives on holoprosencephaly: Part III. Spectra, distinctions, continuities, and discontinuities. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 34(2), 271–288.
- Cohen, M. M. M. (2002). Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 115(4), 245–268.
- Coldwell, S. S., Fitzgerald, B. B., Semmens, J. M. J., Ede, R. R., & Bateman, C. C. (1981). A case of trisomy of chromosome 15. *Journal of Medical Genetics*, 18(2), 146–148.
- Conlon, F. L., Fairclough, L., Price, B., & Casey, E. S. (2001). Determinants of T box protein specificity. *Development*, 128(19), 3749-58.
- Conti, E., Grifone, N., Sarkozy, A., Tandoi, C., Marino, B., Digilio, M. C., et al. (2003). DiGeorge subtypes of nonsyndromic conotruncal defects: evidence against a major role of TBX1 gene. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 11(4), 349–351.
- Cortese, K., Giordano, F., Surace, E. M., & Venturi, C. (2005). The ocular albinism type 1 (OA1) gene controls melanosome maturation and size. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46 (12), 4358-64.

- Costa, T. T., Ramsby, G. G., Cassia, F. F., Peters, K. R. K., Soares, J. J., Correa, J. J., et al. (1998). Grebe syndrome: clinical and radiographic findings in affected individuals and heterozygous carriers. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 75(5), 523–529.
- Coupry, I., Taine, L., Goizet, C., Soriano, C., Mortemousque, B., Arveiler, B. T., & Lacombe, D. (2001). Leucodystrophy and oculocutaneous albinism in a child with an 11q14 deletion. *Journal of Medical Genetics*, 38(1), 35–38.
- Cox, C. J. C., Espinoza, H. M. H., McWilliams, B. B., Chappell, K. K., Morton, L. L., Hjalt, T. A. T., et al. (2002). Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25001–25010.
- Creel, D. D., O'Donnell, F. E. F., & Witkop, C. J. C. (1978). Visual system anomalies in human ocular albinos. *Science*, 201(4359), 931–933.
- Crider, K. S., Olney, R. S., & Cragan, J. D. (2008). Trisomies 13 and 18: population prevalences, characteristics, and prenatal diagnosis, metropolitan Atlanta, 1994–2003. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146(7), 820–826.
- Cross, S. J., Ching, Y., & Li, Q. (2000). The mutation spectrum in Holt-Oram syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 37(10), 785–787.
- Cruciani, V. V., & Mikalsen, S. O. S. (2002). Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biology of the Cell*, 94(7-8), 433–443.
- Cuneo, B. F. B. (2001). 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomaly face syndromes. *Current Opinion in Pediatrics*, 13(5), 465–472.

D

- d'Addio, M., Pizzigoni, A., Bassi, M. T., Baschirotto, C., Valetti, C., Incerti, B., et al. (2000). Defective intracellular transport and processing of OA1 is a major cause of ocular albinism type 1. *Human Molecular Genetics*, 9 (20), 3011–3018.
- da Silva, E. O., Janovitz, D., & de Albuquerque, S. C. (1980). Ellis-van Creveld syndrome: report of 15 cases in an inbred kindred. *Journal of Medical Genetics*, 17(5), 349–356.
- Dalgleish, R. (1997). The Human Collagen Mutation Database 1998. *Nucleic Acids Research*, 26(1), 253–255.
- De Paepe, A., Devereux, R. B., Dietz, H. C., Hennekam, R. C., & Pyeritz, R. E. (1996). Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 62(4), 417–426.
- de Wet, W. W., Bernard, M. M., Benson-Chanda, V. V., Chu, M. L. M., Dickson, L. L., Weil, D. D., & Ramirez, F. F. (1987). Organization of the human pro-alpha 2(I) collagen gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(33), 16032–16036.
- Delezoide, A. L. A., Narcy, F. F., & Larroche, J. C. J. (1990). Cerebral midline developmental anomalies: spectrum and associated features. *Genetic Counseling (Geneva, Switzerland)*, 1 (3-4), 197–210.
- Demyer, W. W., Zeman, W. W., & Palmer, C. G. C. (1964). The face predicts the brain: diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). *Pediatrics*, 34, 256–263.
- Diego-Alvarez, D. D., Garcia-Hoyos, M. M., Trujillo, M. J. M., Gonzalez-Gonzalez, C. C., de Alba, M. M. R., Ayuso, C. C., et al. (2005). Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Human Reproduction*, 20(5), 1235–1243.

- Diego-Alvarez, D., Ramos-Corrales, C., García-Hoyos, M., Bustamante-Aragones, A., Cantalapiedra, D., Diaz-Recasens, J., et al. (2006). Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Human Reproduction*, 21(4), 958–966.
- Dietz, H. C., Cutting, G. R., Pyeritz, R. E., Maslen, C. L., Sakai, L. Y., Corson, G. M., et al. (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*, 352(6333), 337–339.
- Dietz, H. C. H., & Pyeritz, R. E. R. (1995). Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Human Molecular Genetics*, 4 Spec No, 1799–1809.
- Dolan, C. R., Stephens, K., Adam, M. P., Alter, B. P., & Kupfer, G. (2002). Fanconi Anemia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993*.
- Donnenfeld, A. E. A., Nazir, M. A. M., Sindoni, F. F., & Librizzi, R. J. R. (1991). Prenatal sonographic documentation of cystic hygroma regression in Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 39(4), 461–465.
- Down, J. L. (1995). *Observations on an ethnic classification of idiots. 1866. Mental Retardation* 33(1), 54–56.
- Duarte, A. C. A., Menezes, A. I. C. A., Devens, E. S. E., Roth, J. M. J., Garcias, G. L. G., & Martino-Roth, M. G. M. (2004). Patau syndrome with a long survival. A case report. *Genetics and Molecular Research*, 3(2), 288–292.
- Dubourg, C. L., Lazaro, L. L., Pasquier, L., Bendavid, C., Blayau, M., Duff, F. L., et al. (2004). Molecular screening of *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF* genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Human Mutation*, 24(1), 43–51.
- Dunwoodie, S. L. (2007). Combinatorial signaling in the heart orchestrates cardiac induction, lineage specification and chamber formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(1), 13–13.
- Durham-Pierre, D., Gardner, J. M., Nakatsu, Y., King, R. A., Francke, U., Ching, A., et al. (1994). African origin of an intragenic deletion of the human *P* gene in tyrosinase positive oculocutaneous albinism. *Nature Genetics*, 7(2), 176–179.

E

- Eccles, D. D., Meek, D. D., & Nwosu, E. C. E. (2003). Noonan syndrome: diagnostic difficulties. A case report and literature review. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 23(6), 666–667.
- Edelmann, L. (1999a). A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Human Molecular Genetics*, 8(7), 1157–1167.
- Edelmann, L., Pandita, R. K., & Morrow, B. E. (1999b). Low-Copy Repeats Mediate the Common 3-Mb Deletion in Patients with Velo-cardio-facial Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 64(4), 1076–1086.
- Edwards, J. H., Harnden, D. G., Cameron, A. H., & Crosse, V. M. (1960). A new trisomic syndrome. *The Lancet*. 1(7128):787-90.
- Ellis, R. W. R., & van Creveld, S. S. (1940). A Syndrome Characterized by Ectodermal Dysplasia, Polydactyly, Chondro-Dysplasia and Congenital Morbus Cordis: Report of Three Cases. *Archives of Disease in Childhood*, 15(82), 65–84.
- Emanuel, B. S. B. (2008). Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 14(1), 11–18.

- Encode Project Consortium, Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., et al. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489 (7414), 57–74.
- Engel, J. J., & Prockop, D. J. D. (1991). The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Biophysics and Biophysical Chemistry*, 20, 137–152.
- Engenheiro, E. E., Saraiva, J. J., Carreira, I. I., Ramos, L. L., Ropers, H. H. H., Silva, E. E., et al. (2007). Cytogenetically invisible microdeletions involving PITX2 in Rieger syndrome. *Clinical Genetics*, 72(5), 464–470.
- Ensenauer, R. E., Adeyinka, A., Flynn, H. C., Michels, V. V., Lindor, N. M., Dawson, D. B., et al. (2003). Microduplication 22q11.2, an Emerging Syndrome: Clinical, Cytogenetic, and Molecular Analysis of Thirteen Patients. *American Journal of Human Genetics*, 73(5), 14–14.
- Eurocat central Registry. (2004). A Review of Environmental Risk Factors for Congenital Anomalies, 1–104.
- Eyaid, W. W., Al-Qattan, M. M. M., Abdulkareem, Al, I. I., Fetaini, N. N., & Balwi, Al, M. M. (2011). A novel homozygous missense mutation (c.610G>A, p.Gly204Ser) in the WNT7A gene causes tetra-amelia in two Saudi families. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155A (3), 599–604.

F

- Faivre, L., Collod-Beroud, G., Loeys, B. L., Child, A., Binquet, C., Gautier, E., et al. (2007). Effect of Mutation Type and Location on Clinical Outcome in 1,013 Proband with Marfan Syndrome or Related Phenotypes and FBN1 Mutations: An International Study. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 454–466.
- Fang, S., Guo, X., Jia, X., Xiao, X., Li, S., & Zhang, Q. (2008). Novel GPR143 mutations and clinical characteristics in six Chinese families with X-linked ocular albinism. *Molecular Vision*, 14, 1974–1982.
- Fára, M. M., Horák, I. I., Hrivnáková, J. J., Kapras, J. J., Nová, M. M., & Stloukalová, M. M. (1976). Oculodentodigital dysplasia. *Acta Chirurgiae Plasticae*, 19(2), 110–122.
- Feit, L. R. L. (1997). Genetics of congenital heart disease: strategies. *Advances in Pediatrics*, 45, 267–292.
- Ferencz, C., Neill, C. A., Boughman, J. A., Rubin, J. D., Brenner, J. I., & Perry, L. W. (1989). Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: An epidemiologic study. *The Journal of Pediatrics*, 114(1), 79–86.
- Fernández García-Moya, L., Lapunzina Badía, P., Delicado Navarro, A., Sharif, A., Cross, G., Mori Álvarez, M. ^a, et al. (2006). Síndrome de Holt-Oram: caracterización de una nueva mutación. *Anales De Pediatría*, 64(6), 578–582.
- Findlay, I., Ray, P., Quirke, P., Rutherford, A., & Lilford, R. (1995). Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Human Reproduction*, 10(6), 1609–1618.
- Flanagan, S. E., Patch, A.-M., & Ellard, S. (2010). Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 14(4), 533–537.
- Footz, T., Idrees, F., Acharya, M., Kozlowski, K., & Walter, M. A. (2009). Analysis of Mutations of the PITX2 Transcription Factor Found in Patients with Axenfeld-Rieger Syndrome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(6), 2599–2606.

- Forteza, A., Evangelista, A., Sánchez, V., & Teixidó, G. (2011). Valoración de la eficacia y la seguridad del losartán frente al atenolol en la prevención de la dilatación de la aorta en el síndrome de Marfan. *Revista Española De Cardiología*, 64, 492-8
- Francis-West, P. H. P., Abdelfattah, A. A., Chen, P. P., Allen, C. C., Parish, J. J., Ladher, R. R., et al. (1999). Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development*, 126(6), 1305–1315.
- Fujita, H., Torii, C., Kosaki, R., Yamaguchi, S., Kudoh, J., Hayashi, K., et al. (2010). Microdeletion of the Down syndrome critical region at 21q22. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(4), 950–953.
- Furniss, D., Kan, S.-H., Taylor, I. B., Johnson, D., Critchley, P. S., Giele, H. P., & Wilkie, A. O. M. (2009). Genetic screening of 202 individuals with congenital limb malformations and requiring reconstructive surgery. *Journal of Medical Genetics*, 46(11), 730–735.
- Fusco, F. F., Paciolla, M. M., Napolitano, F. F., Pescatore, A. A., D'Addario, I. I., Bal, E. E., et al. (2012). Genomic architecture at the Incontinentia Pigmenti locus favours de novo pathological alleles through different mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1260–1271.

G

- Gage, P. J. P., Suh, H. H., & Camper, S. A. S. (1999). Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*, 126(20), 4643–4651.
- Galdzicka, M. M., Patnala, S. S., Hirshman, M. G. M., Cai, J.-F. J., Nitowsky, H. H., EGELAND, J. A. J., & Ginns, E. I. E. (2002). A new gene, EVC2, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*, 77(4), 291–295.
- García, M. M., & Rodríguez, M. G. (2000). Genética de las cardiopatías congénitas. *Anales Españoles de Pediatría*, 53, 30-39.
- Gargiulo, A., Testa, F., Rossi, S., Di Iorio, V., Fecarotta, S., de Berardinis, T., et al. (2011). Molecular and clinical characterization of albinism in a large cohort of Italian patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(3), 1281–1289.
- Garrido-Allepuz, C., Haro, E., González-Lamuño, D., Martínez-Frías, M. L., Bertocchini, F., & Ros, M. A. (2011). A clinical and experimental overview of sirenomelia: insight into the mechanisms of congenital limb malformations. *Disease Models & Mechanisms*, 4(3), 289–299.
- Geipel, A., Willruth, A., & Vieten, J. (2010). Nuchal fold thickness, nasal bone absence or hypoplasia, ductus venosus reversed flow and tricuspid valve regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 in the early second trimester. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 35(5), 535-9.
- Gekas, J. J., Sergi, C. C., & Kamnasaran, D. D. (2012). Molecular prenatal diagnosis of a sporadic alobar holoprosencephalic fetus: genotype-phenotype correlations. *Audio and Electroacoustics Newsletter, IEEE*, 6(3), 36–39.
- Georges, R. R., Nemer, G. G., Morin, M. M., Lefebvre, C. C., & Nemer, M. M. (2008). Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 28(12), 4052–4067.
- Gershoni-Baruch, R., Rosenmann, A., Droetto, S., Holmes, S., Tripathi, R. K., & Spritz, R. A. (1994). Mutations of the tyrosinase gene in patients with oculocutaneous albinism from various ethnic groups in Israel. *American Journal of Human Genetics*, 54(4), 586–594.

- Ghosh, T. K. T., Packham, E. A. E., Bonser, A. J. A., Robinson, T. E. T., Cross, S. J. S., & Brook, J. D. J. (2001). Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Human Molecular Genetics*, 10(18), 1983–1994.
- Giebel LB, Spritz RA (1990). RFLP for MboI in the human tyrosinase (TYR) gene detected by PCR *Proc Natl Acad Sci*, 87(9):3255–3258
- Gilboa, L. L., Nohe, A. A., Geissendörfer, T. T., Sebald, W. W., Henis, Y. I. Y., & Knaus, P. P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3), 1023–1035.
- Gillespie, F. D. (1964). A Hereditary Syndrome: “Dysplasia Oculodentodigitalis.” *Archives of Ophthalmology*, 71(2), 187–192.
- Giménez, E., Giraldo, P., Jeffery, G., & Montoliu, L. (2001). Variegated expression and delayed retinal pigmentation during development in transgenic mice with a deletion in the locus control region of the tyrosinase gene. *Genesis*, 30(1), 21–25.
- Gladwin, A., Donnai, D., Metcalfe, K., Schrandt-Stumpel, C., Brueton, L., Verloes, A., et al. (1997). Localization of a gene for oculodentodigital syndrome to human chromosome 6q22-q24. *Human Molecular Genetics*, 6(1), 123–127.
- Glaser, T. T., Walton, D. S. D., & Maas, R. L. R. (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nature Genetics*, 2(3), 232–239.
- Goland, S., & Elkayam, U. (2009). Cardiovascular problems in pregnant women with marfan syndrome. *Circulation*, 119(4), 619–623.
- Gonen, R. R., Dar, H. H., & Degani, S. S. (1995). The karyotype of fetuses with anomalies detected by second trimester ultrasonography. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 58(2), 153–155.
- Gong, W., Gottlieb, S., Collins, J., Blescia, A., Dietz, H., Goldmuntz, E., et al. (2001). Mutation analysis of TBX1 in non-deleted patients with features of DGS/VCFS or isolated cardiovascular defects. *Journal of Medical Genetics*, 38(12), E45–E45.
- Gray, J. R., Bridges, A. B., Faed, M. J., Pringle, T., Baines, P., Dean, J., & Boxer, M. (1994). Ascertainment and severity of Marfan syndrome in a Scottish population. *Journal of Medical Genetics*, 31(1), 51–54.
- Grønskov, K., Ek, J. J., & Brøndum-Nielsen, K. K. (2007). Oculocutaneous Albinism. *Journal of Rare Diseases*, 2, 43–43.
- Grønskov, K., Ek, J., Sand, A., Scheller, R., Bygum, A., Brixen, K., et al. (2009). Birth prevalence and mutation spectrum in danish patients with autosomal recessive albinism. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(3), 1058–1064.
- Guilherme, R. S. R., Meloni, V. F. A. V., Kim, C. A. C., Pellegrino, R. R., Takeno, S. S. S., Spinner, N. B. N., et al. (2011). Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *BMC Medical Genetics*, 12, 171–171.
- Guilherme, R. S., Kim, C. A., Alonso, L. G., Honjo, R. S., Meloni, V. A., Christofolini, D. M., et al. (2012). Ring chromosome 10: report on two patients and review of the literature. *Journal of Applied Genetics*, 54(1), 35–41.
- Guillén-Navarro, E., & Ballesta-Martínez, M. J. (2011). Genética y enfermedad. Concepto de genética médica. *Nefrología*, 2(1), 3–10
- Guo, T., McGinn, D. M., & Blonska, A. (2011). Genotype and cardiovascular phenotype correlations with TBX1 in 1,022 velo-cardio-facial/digeorge/22q11. 2 deletion syndrome patients. *Human Mutation*, 32(11):1278–89.

Gurrieri, F., Trask, B. J., van den Engh, G., Krauss, C. M., Schinzel, A., Pettenati, M. J., et al. (1993). Physical mapping of the holoprosencephaly critical region on chromosome 7q36. *Nature Genetics*, 3(3), 247–251.

H

Habashi, J. P., Judge, D. P., Holm, T. M., Cohn, R. D., Loeys, B. L., Cooper, T. K., et al. (2006). Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, 312(5770), 117–121.

Hall, J. G. J., & Gilchrist, D. M. D. (1990). Turner syndrome and its variants. *Pediatric Clinics of North America*, 37(6), 1421–1440.

Halushka, M. K. (2012). Single gene disorders of the aortic wall. *Cardiovascular Pathology : the Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 21(4), 240–244.

Harper, J. C. J., Wilton, L. L., Traeger-Synodinos, J. J., Goossens, V. V., Moutou, C. C., SenGupta, S. B. S., et al. (2012). The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Human Reproduction Update*, 18(3), 234–247.

Hatcher, C. J., & Basson, C. T. (2001, November). Getting the T-box dose right. *Nature Medicine*, pp. 1185–1186.

Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, J., et al. (1980). A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Annals of Human Genetics*, 44(Pt 2), 151–178.

Hassold, T., & Chiu, D. (1985). Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human Genetics*, 70(1), 11–17.

Hassold, T. J. (1986). Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends in Genetics*, 2, 105–110.

Hassold, T. T., Abruzzo, M. M., Adkins, K. K., Griffin, D. D., Merrill, M. M., Millie, E. E., et al. (1995). Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 28(3), 167–175.

Hassold, T., & Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews. Genetics*, 2(4), 280–291.

Hassold, T., Hall, H., & Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics*, 16(R2), R203–R208.

Hellmann, T. V., Nickel, J., & Mueller, T. D. (2012). Missense Mutations in GDF-5 Signaling: Molecular Mechanisms Behind Skeletal Malformation, Mutations in Human Genetic Disease, Prof. David Cooper (Ed.), ISBN: 978-953-51-0790-3, InTech.

Hilhorst-Hofstee, Y., Hamel, B. C. J., Verheij, J. B. G. M., Rijlaarsdam, M. E. B., Mancini, G. M. S., Cobben, J. M., et al. (2011). The clinical spectrum of complete FBN1 allele deletions. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 19(3), 247–252.

Hjalt, T. A., & Semina, E. V. (2005). Current molecular understanding of Axenfeld-Rieger syndrome. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(25), 1–17.

Hoffman, J., & Kaplan, S. (2002). The incidence of congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology* 39(12),1890-900

Holmes, L. B., Driscoll, S. G., & Atkins, L. (1976). Etiologic heterogeneity of neural-tube defects. *New England Journal of medicine*, 294(7),365–369.

- Hook, E. B. E., Marden, P. M. P., Reiss, N. P. N., & Smith, D. W. D. (1976). Some aspects of the epidemiology of human minor birth defects and morphological variants in a completely ascertained newborn population (Madison study). *Teratology*, 13(1), 47–55.
- Hook, E. B. (1983). Chromosome abnormalities and spontaneous fetal death following amniocentesis: further data and associations with maternal age. *American Journal of Human Genetics*, 35(1), 110–6.
- Horigome, H. H., Hamada, H. H., Sohda, S. S., Oyake, Y. Y., & Kurosaki, Y. Y. (1997). Prenatal ultrasonic diagnosis of a case of Ellis-van Creveld syndrome with a single atrium. *Pediatric Radiology*, 27(12), 942–944.
- Hoyle, D. J. D., Rodriguez-Fernandez, I. A. I., & Dell'angelica, E. C. E. (2011). Functional interactions between OCA2 and the protein complexes BLOC-1, BLOC-2, and AP-3 inferred from epistatic analyses of mouse coat pigmentation. *Pigment Cell Research*, 24(2), 275–281.
- Hu, J., Shekhter-Levin, S., Shaw, P. H., Bay, C., Kochmar, S., & Surti, U. (2005). Risk and recurrence risk of Down syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 156(1), 62–67.
- Hung, C.-S., Lin, J.-L., Lee, Y.-J., Lin, S.-P., Chao, M.-C., & Lo, F.-S. (2007). Mutational analysis of PTPN11 gene in Taiwanese children with Noonan syndrome. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 106(2), 169–172.
- Hung, C.-C., Lin, S.-Y., Lee, C.-N., Cheng, H.-Y., Lin, S.-P., Chen, M.-R., et al. (2009). Mutation spectrum of the fibrillin-1 (FBN1) gene in Taiwanese patients with Marfan syndrome. *Annals of Human Genetics*, 73(Pt 6), 559–567.
- Hunter, A. G. A., & Rudd, N. L. N. (1976). Craniosynostosis. I. Sagittal synostosis: its genetics and associated clinical findings in 214 patients who lacked involvement of the coronal suture(s). *Teratology*, 14(2), 185–193.
- Hutton, S. M., & Spritz, R. A. (2008). Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-Hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2442–2450.

I

- Idrees, F. F., Vaideanu, D. D., Fraser, S. G. S., Sowden, J. C. J., & Khaw, P. T. P. (2006). A review of anterior segment dysgeneses. *Survey of Ophthalmology*, 51(3), 213–231.
- Icardo, J. M., Rincón, J. G., & Ros, M. A. (2002). Malformaciones cardíacas, heterotaxia y lateralidad. *Revista Espanola De Cardiologia*, 55(9), 962–974.
- Iliopoulos, D., Sekerli, E., Vassiliou, G., Sidiropoulou, V., Topalidis, A., Dimopoulou, D., & Voyiatzis, N. (2005). Patau syndrome with a long survival (146 months): a clinical report and review of literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 140(1), 92–93.
- Inagaki, K., Suzuki, T., Shimizu, H., Ishii, N., Umezawa, Y., Tada, J., et al. (2004). Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *American Journal of Human Genetics*, 74(3), 466–471.
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of Mixed Melanogenesis—Pivotal Roles of Dopaquinone. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 582–592.

J

- Jacobs, P., Dalton, P., James, R., Mosse, K., Power, M., Robinson, D., & Skuse, D. (1997). Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Annals of Human Genetics*, 61(Pt 6), 471–483.
- Jeffery, G., Brem, G., & Montoliu, L. (1997). Correction of retinal abnormalities found in albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice and rabbits. *Developmental Brain Research*, 99(1), 95–102.
- Jin, C., Yao, K., Jiang, J., Tang, X., Shentu, X., & Wu, R. (2007). Novel FBN1 mutations associated with predominant ectopia lentis and marfanoid habitus in Chinese patients. *Molecular Vision*, 13, 1280–1284.
- Jones, K. L. (2006). *SMITH. Patrones reconocibles de malformaciones humanas, 6a ed.*. Elsevier España.
- Jongmans, M. M., Sistermans, E. A. E., Rikken, A. A., Nillesen, W. M. W., Tamminga, R. R., Patton, M. M., et al. (2005). Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: new data and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 134A(2), 165–170.
- Judisch, G. F. G., Martin-Casals, A. A., Hanson, J. W. J., & Olin, W. H. W. (1979). Oculodentodigital dysplasia. Four new reports and a literature review. *Archives of Ophthalmology*, 97(5), 878–884.
- Judge, D. P. D., Biery, N. J. N., & Dietz, H. C. H. (2001). Characterization of microsatellite markers flanking FBN1: utility in the diagnostic evaluation for Marfan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 99(1), 39–47.

K

- Källén, B., Mastroiacovo, P., & Robert, E. (1998). Major congenital malformations in Down syndrome - Källén- *American Journal of Medical Genetics* 65, 160–166
- Kalousek, D. K., Barrett, I. J., & McGillivray, B. C. (1989). Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *American Journal of Human Genetics*, 44(3), 338–343.
- Kalousek, D. K., Pantzar, T., Tsai, M., & Paradice, B. (1993). Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3,912 cases. *Birth Defects Original Article Series*, 29(1), 53–61.
- Katayama, K. P. K., Wilkinson, E. J. E., Herrmann, J. J., Glaspey, J. C. J., Agarwal, A. B. A., Roesler, M. R. M., & Mattingly, R. F. R. (1980). Clinical delineation of trisomy 9 syndrome. *Obstetrics & Gynecology*, 56(5), 665–668.
- Kelly, T. E. (1986). *Clinical genetics and genetic counseling*. Chicago: Year book.
- Kim, G. R., Bartlett, E. L., & Lehmann, H. P. (2005). Information resource preferences by general pediatricians in office settings: a qualitative study. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 5, 34.
- King, R. A., & Summers, C. G. (1988). Albinism. *Dermatologic Clinics*, 6(2), 217–228.
- King, R. A., Hearing, V. J., Creel, D. J., Oetting, W. S., & Sriver, C. R. (1995). Albinism. In *The Metabolic and Molecular bases of inherited Disease*. (Edited by S. CR, B. AL, S. WS, V. D. N. York, McGraw-Hill, & Inc, Eds.), 4353–4392.
- King, R. A. R., Pietsch, J. J., Fryer, J. P. J., Savage, S. S., Brott, M. J. M., Russell-Eggitt, I. I., et al. (2003). Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): definition of the phenotype. *Human Genetics*, 113(6), 502–513.

- Kobrynski, L. J., & Sullivan, K. E. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *The Lancet*, 370(9596), 1443–1452.
- Kooper, A. J. A. A., Faas, B. H. W. B., Feuth, T. T., Creemers, J. W. T. J., Zondervan, H. H. H., Boekkooi, P. F. P., et al. (2008a). Detection of Chromosome Aneuploidies in Chorionic Villus Samples by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(1), 8–8.
- Kooper, A., Faas, B., & Baats, E. K. (2008b). Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenatal Diagnosis*, 28(11), 1004–10.
- Körkkö J, Kaitila I, Lönnqvist L, Peltonen L & Ala-Kokko L (2002). Sensitivity of conformation sensitive gel electrophoresis in detecting mutations in Marfan syndrome and related conditions. *Journal of Medical Genetics*, 39(1):34–41.
- Kromberg, J. G. J., & Jenkins, T. T. (1982). Prevalence of albinism in the South African negro. *South African Medical Journal/Suid-Afrikaanse Mediese Tydskrift*, 61(11), 383–386.
- Kuller, J. A. J., & Laifer, S. A. S. (1991). Trisomy 15 associated with nonimmune hydrops. *American Journal of Perinatology*, 8(1), 39–40.

L

- Laird, D. W. D. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochemical Journal*, 394(Pt 3), 527–543.
- Lanie, A. D., Jayaratne, T. E., Sheldon, J. P., Kardia, S. L. R., Anderson, E. S., Feldbaum, M., & Petty, E. M. (2004). Exploring the public understanding of basic genetic concepts. *Journal of Genetic Counseling*, 13(4), 305–320.
- Lavado, A. A., Jeffery, G. G., Tovar, V. V., la Villa, de, P. P., & Montoliu, L. L. (2006). Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *Journal of Neurochemistry*, 96(4), 1201–1211.
- Layman, L. C. L. (2002). Human gene mutations causing infertility. *Journal of Medical Genetics*, 39(3), 153–161.
- Lee, S. T., Nicholls, R. D., Jong, M. T., Fukai, K., & Spritz, R. A. (1995). Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. *Genomics*, 26(2), 354–363.
- Lee, K. A., Williams, B., Roza, K., Ferguson, H., David, K., Eddleman, K., et al. (2009). PTPN11 analysis for the prenatal diagnosis of Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Clinical Genetics*, 75(2), 190–194.
- Lengauer, C., Riethman, H., & Cremer, T. (1990). Painting of human chromosomes with probes generated from hybrid cell lines by PCR with Alu and L1 primers. *Human Genetics*, 86(1), 1–6.
- Lehmann, Sowden, Carlsson, Jordan, Bhattacharya. (2003). Fox's in development and disease. *Trends in Genetics*, 19(6), 339–344.
- Lejeune, J., Gautier, M., & Turpin, R. (1959). Etudes des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens (Studies on somatic chromosomes from nine mongoloid children. *J. C. R. Hedomadaires Des Seances De L' Acad Des Sci.*, 248, 1721–1722.
- Lenz, W., & Knapp, K. (1962). Thalidomide embryopathy. *Archives of Environmental Health*, 5: 100–105.

- Leppig, K. A., Werler, M. M., Cann, C. I., Cook, C. A., & Holmes, L. B. (1987). Predictive value of minor anomalies. I. Association with major malformations. *The Journal of Pediatrics*, 110(4), 531–537.
- Leppik, I. E. I. (1990). How to get patients with epilepsy to take their medication. The problem of noncompliance. *Postgraduate Medicine*, 88(1), 253–256.
- Li, Q. Y. Q., Newbury-Ecob, R. A. R., Terrett, J. A. J., Wilson, D. I. D., Curtis, A. R. A., Yi, C. H. C., et al. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature Genetics*, 15(1), 21–29.
- Liao, G. J. W. G., Chan, K. C. A. K., Jiang, P. P., Sun, H. H., Leung, T. Y. T., Chiu, R. W. K. R., & Lo, Y. M. D. Y. (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 by allelic ratio analysis using targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *PLoS ONE*, 7(5), e38154–e38154.
- Lin, S.-Y. S., Chien, S.-C. S., Su, Y.-N. Y., Lee, C.-N. C., & Chen, C.-P. C. (2006). Rapid genetic analysis of oculocutaneous albinism (OCA1) using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) system. *Prenatal Diagnosis*, 26(5), 466–470.
- Lindsay, M. E., & Dietz, H. C. (2011). Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature*, 473(7347), 308–316.
- Lippe, B. B. (1991). Turner syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 20(1), 121–152.
- Liu WO, Oefner PJ, Qian C, Odom RS, Francke U, (1997-1998). Denaturing HPLC-identified novel FBN1 mutations, polymorphisms, and sequence variants in Marfan syndrome and related connective tissue disorders. *Genetic Testing*, 1(4):237-42
- Loeys, B., Nuytinck, L., Delvaux, I., De Bie, S., & De Paepe, A. (2001). Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 161(20), 2447–2454.
- Loeys, B. L., Dietz, H. C., Braverman, A. C., Callewaert, B. L., De Backer, J., Devereux, R. B., et al. (2010). The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 47(7), 476–485.
- Lomax, B., Tang, S., Separovic, E., Phillips, D., Hillard, E., Thomson, T., & Kalousek, D. K. (2000). Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1516–1521.
- Lo, Y. M. Y., Corbetta, N. N., Chamberlain, P. F. P., Rai, V. V., Sargent, I. L. I., Redman, C. W. C., & Wainscoat, J. S. J. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350(9076), 3–3.
- Lopez, V. M., Decatur, C. L., Stamer, W. D., & Lynch, R. M. (2008). L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biology*. 6(9), e236
- Lorda-Sanchez, I. I., Binkert, F. F., Maechler, M. M., & Schinzel, A. A. (1992). Molecular study of 45,X conceptuses: correlation with clinical findings. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 42(4), 487–490.
- Luyten, F. P. F. (1997). Cartilage-derived morphogenetic protein-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(11), 1241–1244.

M

- Machin, G. A. G. (1989). Hydrops revisited: literature review of 1,414 cases published in the 1980s. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 34(3), 366–390.
- Maciá, J. M. C., Dexeus, J., Dols, J. M., & Zantop, B. S. (2006). *Carrera, J.M., Protocolos de obstetricia y medicina perinatal del Instituto Universitario Dexeus, 4a ed.* Elsevier España.
- Marini, J. C. J., Forlino, A. A., Cabral, W. A. W., Barnes, A. M. A., Antonio, J. D. J. S., Milgrom, S. S., et al. (2007). Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Human Mutation*, 28(3), 209–221.
- Martin, E. E., & Shapiro, J. R. J. (2007). Osteogenesis imperfecta: epidemiology and pathophysiology. *Current Osteoporosis Reports*, 5(3), 91–97.
- Martínez-Frías, M. L. M., Frías, J. L. J., & Opitz, J. M. J. (1998). Errors of morphogenesis and developmental field theory. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 76(4), 291–296.
- Martínez-Frías, M. L. (2010). Características generales de los defectos congénitos, terminología y causas. *Semergen - Medicina De Familia*, 36(3), 135–139.
- Martínez-García, M., Riveiro-Alvarez, R., Villaverde-Montero, C., Cantalapiedra, D., García-Sandoval, B., Ayuso, C., & Trujillo-Tiebas, M. J. (2010). Identification of a novel deletion in the OA1 gene: report of the first Spanish family with X-linked ocular albinism. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 38(5), 489–495.
- Martínez-García, M., Ainse, E., García-Hoyos, M., Bustamante, A., Cardero, R., Ramos-Corrales, C., et al. (2011). Broadening our understanding by the use of molecular cytogenetic techniques: full monosomy 21. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(7), 621–6.
- Marugan, V. M., & Sangrador, C. O. (2006). Manejo perinatal de los defectos congénitos. *Boletín de Pediatría*, 46(1), 151–159.
- Mary Holt, S. O. (1960). Familial heart disease with skeletal malformations. *British Heart Journal*, 22(2), 236.
- McDermott, D. A. D., Bressan, M. C. M., He, J. J., Lee, J. S. J., Aftimos, S. S., Brueckner, M. M., et al. (2005). TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome. *Pediatric Research*, 58(5), 981–986.
- McDonald-McGinn, D. M., Emanuel, B. S., & Zackai, E. H. (2013). "22q11. 2 deletion syndrome. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-*
- McFadden, D. E., Kwong, L. C., Yam, I. Y., & Langlois, S. (1993). Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting. *Human Genetics*, 92(5), 465–469.
- McFadden, D. E., & Robinson, W. P. (2006). Phenotype of triploid embryos. *Journal of Medical Genetics*, 43(7), 609–612.
- McKusick, V. A. V., Egelnd, J. A. J., Eldridge, R. R., & Krusen, D. E. D. (1964). Dwarfism in the Amish I. The Ellis van Creveld syndrome. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 115, 306–336.
- McKusick, V. A. V. (2000). Ellis-van Creveld syndrome and the Amish. *Nature Genetics*, 24(3), 203–204.
- Mears, A. J. A., Jordan, T. T., Mirzayans, F. F., Dubois, S. S., Kume, T. T., Parlee, M. M., et al. (1998). Mutations of the Forkhead/Winged-Helix Gene, FKHL7, in Patients with Axenfeld-Rieger Anomaly. *American Journal of Human Genetics*, 63(5), 13–13.

- Méhes, K. (1985). Minor malformations in the neonate: utility in screening infants at risk of hidden major defects. *Progress in Clinical and Biological Research*, 163C, 45–49.
- Meijboom, L. J. L., Drenthen, W. W., Pieper, P. G. P., Groenink, M. M., van der Post, J. A. M. J., Timmermans, J. J., et al. (2006). Obstetric complications in Marfan syndrome. *International Journal of Cardiology*, 110(1), 7–7.
- Mese G, Richard G and White T.M. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.*, 127(11), 2516-24
- Micale, L., Augello, B., Fusco, C., Turturo, M. G., Granatiero, M., Piemontese, M. R., et al. (2009). GPR143 Mutational Analysis in Two Italian Families with X-Linked Ocular Albinism. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(4), 527–531.
- Milewicz DM, Grossfield J, Cao SN, Kielty C, Covitz W, Jewett T (1995). A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 95(5):2373-8
- Ming, J. E. J., Roessler, E. E., & Muenke, M. M. (1998). Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Molecular Medicine Today*, 4(8), 343–349.
- Ming, J. E. J., & Muenke, M. M. (2002). Multiple Hits during Early Embryonic Development: Digenic Diseases and Holoprosencephaly. *American Journal of Human Genetics*, 71(5), 16–16.
- Ming, J. E. J., Geiger, E. E., James, A. C. A., Ciprero, K. L. K., Nimmakayalu, M. M., Zhang, Y. Y., et al. (2006). Rapid detection of submicroscopic chromosomal rearrangements in children with multiple congenital anomalies using high density oligonucleotide arrays. *Audio, Transactions of the IRE Professional Group on*, 27(5), 467–473.
- Miyamoto, T., & Suda, T. (2003). Differentiation and function of osteoclasts. *Keio Journal of Medicine*, 52, 1-7.
- Montoliu, L. L., Umland, T. T., & Schütz, G. G. (1996). A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO Journal*, 15(22), 6026–6034.
- Morello, R. R., Bertin, T. K. T., Chen, Y. Y., Hicks, J. J., Tonachini, L. L., Monticone, M. M., et al. (2006). CRTAP Is Required for Prolyl 3- Hydroxylation and Mutations Cause Recessive Osteogenesis Imperfecta. *Cell*, 127(2), 14–14.
- Mori, M. A. A., Lapunzina, P., Delicado, A., ez, G. N., guez, J. I. R., de Torres, M. A. L., et al. (2004). A prenatally diagnosed patient with full monosomy 21: ultrasound, cytogenetic, clinical, molecular, and necropsy findings. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 127A(1), 69–73.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-50.
- Musil, L. S. L., & Goodenough, D. A. D. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, 74 (6), 1065–1077.
- Mutton, D., Ide, R. G., & Alberman, E. (1998). Trends in prenatal screening for and diagnosis of Down's syndrome: England and Wales, 1989-97. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 317(7163), 922–923.

N

- Nakagawa, M., Hashimoto, K., & Ohira, H. (2006). Prenatal diagnosis of trisomy 9. *Fetal Diagnosis and therapy*, 21(1), 68-71.
- Nakamura, E. E., Miyamura, Y. Y., Matsunaga, J. J., Kano, Y. Y., Dakeishi-Hara, M. M., Tanita, M. M., et al. (2002). A novel mutation of the tyrosinase gene causing oculocutaneous albinism type 1 (OCA1). *Journal of Dermatological Science*, 28(2), 102-105.
- Neel, B. G. B., Gu, H. H., & Pao, L. L. (2003). The “Shp”ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), 10-10.
- Neptune, E. R., Frischmeyer, P. A., Arking, D. E., Myers, L., Bunton, T. E., Gayraud, B., et al. (2003). Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nature Genetics*, 33(3), 407-411.
- Newman, B., & Wallis, G. A. (2003). Skeletal dysplasias caused by a disruption of skeletal patterning and endochondral ossification. *Clinical Genetics*, 63(4), 241-251.
- Newton, J. M., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Gardner, J. M., Davisson, M. T., King, R. A., & Brilliant, M. H. (2001). Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *American Journal of Human Genetics*, 69(5), 981-988.
- Nicolaides, K. H. K. (2004). Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Ymob*, 191(1), 23-23.
- Nicolaides, K. H. (2011). Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenatal Diagnosis*, 31, 7-15.
- Nielsen, J. J., & Wohrlert, M. M. (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Human Genetics*, 87(1), 81-83.
- Nijbroek, G., Sood, S., McIntosh, I., Francomano, C. A., Bull, E., Pereira, L., et al. (1995). Fifteen novel FBN1 mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons. *American Journal of Human Genetics*, 57(1), 8-21.
- Nishimura, D. Y. D., Swiderski, R. E. R., Alward, W. L. W., Searby, C. C. C., Patil, S. R. S., Bennet, S. R. S., et al. (1998). The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. *Nature Genetics*, 19(2), 140-147.
- Nishimura, D. Y. D., Searby, C. C. C., Alward, W. L. W., Walton, D. D., Craig, J. E. J., Mackey, D. A. D., et al. (2001). A Spectrum of FOXC1 Mutations Suggests Gene Dosage as a Mechanism for Developmental Defects of the Anterior Chamber of the Eye. *American Journal of Human Genetics*, 68(2), 9-9.
- Noonan, J. A. (1968). Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. *American Journal of Diseases of Children*, 116(4), 373-380.
- Noonan, J. A. (1994). Noonan syndrome. An update and review for the primary pediatrician. *Clinical Pediatrics*, 33(9), 548-555.
- Nora, J. J. J., Nora, A. H. A., Sinha, A. K. A., Spangler, R. D. R., & Lubs, H. A. H. (1973). The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). *American Journal of Diseases of Children* (1960), 127(1), 48-55.
- Nussbaum, R., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2007). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders: 236-244.

O

- O'Donnell, F. E., Hambrick, G. W., Green, W. R., Iliff, W. J., & Stone, D. L. (1976). X-linked ocular albinism. An oculocutaneous macromelanosomal disorder. *Archives of Ophthalmology*, 94 (11), 1883–1892.
- Oetting, W. S., Witkop, C. J., Brown, S. A., Colomer, R., Fryer, J. P., Bloom, K. E., & King, R. A. (1993). A frequent tyrosinase gene mutation associated with type I-A (tyrosinase-negative) oculocutaneous albinism in Puerto Rico. *American Journal of Human Genetics*, 52(1), 17–23.
- Oetting, W. S. W., & King, R. A. R. (1999). Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Human Mutation*, 13(2), 99–115.
- Olivares, C. C., Jiménez-Cervantes, C. C., Lozano, J. A. J., Solano, F. F., & García-Borrón, J. C. J. (2001). The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochemical Journal*, 354 (1), 131–139.
- Onojafe, I. F. I., Adams, D. R. D., Simeonov, D. R. D., Zhang, J. J., Chan, C.-C. C., Bernardini, I. M. I., et al. (2011). Nitisinone improves eye and skin pigmentation defects in a mouse model of oculocutaneous albinism. *Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3914–3923.
- Orioli, I. M., Castilla, E. E., & Barbosa-Neto, J. G. (1986). The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *Journal of Medical Genetics*, 23(4), 328–332.

P

- Padmanabhan, R. (1998). Retinoic acid-induced caudal regression syndrome in the mouse fetus. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 12(2), 139–151.
- Payne, R. M. R., Johnson, M. C. M., Grant, J. W. J., & Strauss, A. W. A. (1995). Toward a molecular understanding of congenital heart disease. *Circulation*, 91(2), 494–504.
- Paznekas, W. A. W., Boyadjiev, S. A. S., Shapiro, R. E. R., Daniels, O. O., Wollnik, B. B., Keegan, C. E. C., et al. (2003). Connexin 43 (GJA1) Mutations Cause the Pleiotropic Phenotype of Oculodentodigital Dysplasia. *American Journal of Human Genetics*, 72(2), 11–11.
- Paznekas, W. A., Karczeski, B., Vermeer, S., Lowry, R. B., Delatycki, M., Laurence, F., et al. (2009). GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Human Mutation*, 30(5), 724–733.
- Penrose, L. S. L. (1955). Parental age and mutation. *Lancet*, 269(6885), 312–313.
- Penrose, L. S. L. (2009). The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. 1933. *Journal of Genetics*, 88(1), 9–14.
- Peraita-Ezcurra, M., Martínez-García, M., Ruiz-Perez, V. L., Sánchez-Gutiérrez, M. E., Fenollar-Cortés, M., Vélez-Monsalve, C., et al. (2012). Ellis-van Creveld syndrome in a fetus with rhizomelia and polydactyly. Report of a case diagnosed by genetic analysis, and correlation with pathological and radiologic findings. *Gene*, 499(1), 223–225.
- Phatak. (2004). *Antenatal sonographic diagnosis of Patau syndrome (trisomy 13) : A case report. Indian Journal of Radiology and Imaging*, 14(2), 165–167).
- Phillips, J. C. J., del Bono, E. A. E., Haines, J. L. J., Pralea, A. M. A., Cohen, J. S. J., Greff, L. J. L., & Wiggs, J. L. J. (1996). A second locus for Rieger syndrome maps to chromosome 13q14. *American Journal of Human Genetics*, 59(3), 613–619.

- Phillipi, C. A. C., Remington, T. T., & Steiner, R. D. R. (2008). Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), CD005088–CD005088.
- Pierce, B. A. (2010). Genética-Un enfoque conceptual. *Ed. Médica Panamericana*, 832pp.
- Pierpont, M. E. M., Basson, C. T. C., Benson, D. W. D., Gelb, B. D. B., Giglia, T. M. T., Goldmuntz, E. E., et al. (2007). Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*, 115(23), 3015–3038.
- Plageman, T. F., & Yutzey, K. E. (2005). T-box genes and heart development: putting the “T” in heart. *Developmental Dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists*, 232(1), 11–20.
- Plöger, F., Seemann, P., Kegler, M. S.-V., Lehmann, K., Seidel, J., Kjaer, K. W., et al. (2008). Brachydactyly type A2 associated with a defect in proGDF5 processing. *Human Molecular Genetics*, 17(9), 1222–1233.
- Polymeropoulos, M. H. M., Ide, S. E. S., Wright, M. M., Goodship, J. J., Weissenbach, J. J., Pyeritz, R. E. R., et al. (1996). The Gene for the Ellis-van Creveld Syndrome Is Located on Chromosome 4p16. *Genomics*, 35(1), 5–5.
- Poot, M., van der Smagt, J. J., Brilstra, E. H., & Bourgeron, T. (2011). Disentangling the myriad genomics of complex disorders, specifically focusing on autism, epilepsy, and schizophrenia. *Cytogenetic and Genome Research*, 135(3-4), 228–240.
- Porto, M. P. R., Vergani, N., Carvalho, A. C. C., Cernach, M. C. S. P., Brunoni, D., & Perez, A. B. A. (2010). Novel mutations in the TBX5 gene in patients with Holt-Oram Syndrome. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2), 232–236.
- Preising, M., Op de Laak, J. P., & Lorenz, B. (2001). Deletion in the OA1 gene in a family with congenital X linked nystagmus. *The British Journal of Ophthalmology*, 85(9), 1098–1103.
- Preising, M. N., Forster, H., Gonser, M., & Lorenz, B. (2011). Screening of TYR, OCA2, GPR143, and MC1R in patients with congenital nystagmus, macular hypoplasia, and fundus hypopigmentation indicating albinism. *Molecular Vision*, 17, 939-48.
- Pyeritz, R. E. (2000). The Marfan syndrome. *Annual Review of Medicine*, 51, 481–510.

Q

- Qureshi, F. F., Jacques, S. M. S., Evans, M. I. M., Johnson, M. P. M., Isada, N. B. N., & Yang, S. S. S. (1993). Skeletal histopathology in fetuses with chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Creveld syndrome). *American Journal of Medical Genetics Part A*, 45(4), 471–476.

R

- Raghunath, M., Steinmann, B., Delozier-Blanchet, C., Extermann, P., & Superti-Furga, A. (1994). Prenatal diagnosis of collagen disorders by direct biochemical analysis of chorionic villus biopsies. *Pediatric Research*, 36(4), 441–448.
- Ramirez, F., Sakai, L. Y., Rifkin, D. B., & Dietz, H. C. (2007). Extracellular microfibrils in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 64(18), 2437–2446.
- Ranke, M. B. M., & Saenger, P. P. (2001). Turner's syndrome. *Lancet*, 358(9278), 6–6.

- Rasmussen, S. A., Wong, L., Yang, Q., & May, K. M. (2003). Population-based analyses of mortality in trisomy 13 and trisomy 18. *Pediatrics*, 111, 777-84.
- Rauch, F., & Glorieux, F. H. (2004). Osteogenesis imperfecta. *The Lancet*, 363(9418), 1377-1385.
- Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., Becker, C., et al. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 140(19), 2063-2074.
- Ray, K., Chaki, M., & Sengupta, M. (2007). Tyrosinase and ocular diseases: Some novel thoughts on the molecular basis of oculocutaneous albinism type 1. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26(4), 36-36.
- Rebbeck, T. R., Kanetsky, P. A., Walker, A. H., Holmes, R., Halpern, A. C., Schuchter, L. M., et al. (2002). P gene as an inherited biomarker of human eye color. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 11(8), 782-784.
- Rees, J. L. (2003). Genetics of hair and skin color. *Annual Review of Genetics*, 37, 67-90.
- Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293(5532), 1089-93.
- Reisner, S. H. S., Kott, E. E., Bornstein, B. B., Salinger, H. H., Kaplan, I. I., & Gorlin, R. J. R. (1969). Oculodentodigital dysplasia. *American Journal of Diseases of Children*, 118(4), 600-607.
- Richards, A. A., & Garg, V. (2010). Genetics of congenital heart disease. *Current Cardiology Reviews*, 6(2): 91-97.
- Richardson, R., Donnai, D., Meire, F., & Dixon, M. J. (2004). Expression of Gja1 correlates with the phenotype observed in oculodentodigital syndrome/type III syndactyly. *Journal of Medical Genetics*, 41(1), 60-67.
- Richardson, R. J., Joss, S., Tomkin, S., Ahmed, M., Sheridan, E., & Dixon, M. J. (2006). A nonsense mutation in the first transmembrane domain of connexin 43 underlies autosomal recessive oculodentodigital syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 43 (7), e37-e37.
- Rijnders, R. J. R., van der Schoot, C. E. C., Bossers, B. B., de Vroede, M. A. M., & Christiaens, G. C. G. (2001). Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstetrics & Gynecology*, 98(3), 374-378.
- Rinchik, E. M., Bultman, S. J., Horsthemke, B., Lee, S. T., Strunk, K. M., Spritz, R. A., et al. (1993). A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*, 361(6407), 72-76.
- Rizzo, N., Pittalis, M. C., Pilu, G., Orsini, L. F., Perolo, A., & Bovicelli, L. (1990). Prenatal karyotyping in malformed fetuses. *Prenatal Diagnosis*, 10(1), 17-23.
- Roberts, C., Ivins, S. M., James, C. T., & Scambler, P. J. (2005). Retinoic acid down-regulates Tbx1 expression in vivo and in vitro. *Developmental Dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists*, 232(4), 928-938.
- Robinson, A. (1990). Demography and prevalence of Turner syndrome In: Rosenfeld RG, Grumbach MM, eds. *Turner syndrome*. New York: Marcell Dekker, 93-100.
- Robinson, W. P., Bernasconi, F., Mutirangura, A., Ledbetter, D. H., Langlois, S., Malcolm, S., et al. (1993). Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 740-751.
- Robinson, W. P. W., Langlois, S. S., Schuffenhauer, S. S., Horsthemke, B. B., Michaelis, R. C. R., Christian, S. S., et al. (1996). Cytogenetic and age-dependent risk factors associated with uniparental disomy 15. *Prenatal Diagnosis*, 16(9), 837-844.

- Robinson, P. N., & Booms, P. (2001). Human Genome and Diseases: The molecular pathogenesis of the Marfan syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58, 1698–1707.
- Robinson, P. N., Booms, P., Katzke, S., Ladewig, M., Neumann, L., Palz, M., et al. (2002). Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Human Mutation*, 20(3), 153–161.
- Robinson, P. N., Arteaga-Solis, E., Baldock, C., Collod-Beroud, G., Booms, P., De Paepe, A., et al. (2006). The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of Medical Genetics*, 43(10), 769–787.
- Rodriguez, J. O., Ferran, J. F., Lopez, A. F., Sanz, M. I., Buhi, R. M., & Gean, E. (1999). Síndrome de Ellis van Creveld (displasia condroectodérmica). A propósito de un caso clínico. *Anales Españoles de Pediatría*, 50, 74–76.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Vargas, F., Scherer, S. W., Tsui, L. C., & Muenke, M. (1997). Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1847–1853.
- Roessler, E., & Muenke, M. (2010). The molecular genetics of holoprosencephaly. (M. Muenke, B. Solomon, & S. Odent, Eds.) *American Journal of Medical Genetics*, 154(1), 52–61.
- Römer, P. (1932). *Tratado de oftalmología*. Barcelona : Manuel Marín, Editor. 588 pp.
- Rooryck, C., Morice-Picard, F., Elçioglu, N. H., Lacombe, D., Taieb, A., & Arveiler, B. (2008). Molecular diagnosis of oculocutaneous albinism: new mutations in the OCA1-4 genes and practical aspects. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 21(5), 583–587.
- Rosas-Blum, E., Shirsat, P., & Leiner, M. (2007). Communicating genetic information: a difficult challenge for future pediatricians. *BMC Medical Education*, 7, 17.
- Rubin, P. (1964). ON Organizing a dynamic classification of bone dysplasias. *Arthritis and Rheumatism*, 7, 693–708.
- Ruiz, C., Lamm, F., & Hart, P. S. (1999). Turner syndrome and multiple-marker screening. *Clinical Chemistry*, 45(12), 2259–2261.
- Ruiz-Perez, V. L. V., Ide, S. E. S., Strom, T. M. T., Lorenz, B. B., Wilson, D. D., Woods, K. K., et al. (2000). Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodermal dysostosis. *Nature Genetics*, 24(3), 283–286.
- Ruiz-Perez, V. L. V., Tompson, S. W. J. S., Blair, H. J. H., Espinoza-Valdez, C. C., Lapunzina, P. P., Silva, E. O. E., et al. (2003). Mutations in two nonhomologous genes in a head-to-head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 72(3), 728–732.
- Ruiz-Perez, V. L. V., Blair, H. J. H., Rodriguez-Andres, M. E. M., Blanco, M. J. M., Wilson, A. A., Liu, Y.-N. Y., et al. (2007). Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. *Development*, 134(16), 2903–2912.
- Ruiz-Perez, V. L., & Goodship, J. A. (2009). Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodermal dysostosis are caused by cilia-mediated diminished response to hedgehog ligands. (M. A. Parisi & H. V. Toriello, Eds.) *American Journal of Medical Genetics*, 151C(4), 341–351.
- Ryan, A. K. A., Goodship, J. A. J., Wilson, D. I. D., Philip, N. N., Levy, A. A., Seidel, H. H., et al. (1997). Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *Journal of Medical Genetics*, 34(10), 798–804.

S

- Sadler, T. W., & Langman, J. (2007). Embriología médica: con orientación clínica. Edición, 10. Editor, Ed. Médica Panamericana. 174 pp.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., ES., & BEYER, E. C. (2003). Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiological Reviews*, 83(4), 1359–1400.
- Saint-Hilaire, I. G. (1836). *Histoire generale et particulie(re des anomalies de l'organisation chez l'homme et les animaux*. Paris: J.-B. Baillière, 1832-37
- Saiki, R. K. R., Scharf, S. S., Faloona, F. F., Mullis, K. B. K., Horn, G. T. G., Erlich, H. A. H., & Arnheim, N. N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354.
- Saitta, S. C. S., Harris, S. E. S., Gaeth, A. P. A., Driscoll, D. A. D., McDonald-McGinn, D. M. D., Maisenbacher, M. K. M., et al. (2004). Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Human Molecular Genetics*, 13(4), 417–428.
- Sakai, L. Y., Keene, D. R., & Engvall, E. (1986). Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *The Journal of Cell Biology*, 103(6), 2499–2509.
- Salomon, L. J. L., Bernard, J. P. J., Nizard, J. J., & Ville, Y. Y. (2005). First-trimester screening for fetal triploidy at 11 to 14 weeks: a role for fetal biometry. *Prenatal Diagnosis*, 25(6), 479–483.
- Sandoval, R., Sepulveda, W., & Gutierrez, J. (1999). Prenatal diagnosis of nonmosaic trisomy 9 in a fetus with severe renal disease. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 48, 69–72.
- Sanchez-Cascos, A. A. (1978). The recurrence risk in congenital heart disease. *European Journal of Cardiology*, 7(2-3), 197–210.
- Sanson-Fisher, R. W., Campbell, E. M., Redman, S., & Hennrikus, D. J. (1989). Patient-provider interactions and patient outcomes. *The Diabetes Educator*, 15(2), 134–138.
- Sato, K., & Takayanagi, H. (2006). Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. *Current Opinion in Rheumatology*, 18(4), 419–426.
- Schiaffino, M. V. M., Bassi, M. T. M., Galli, L. L., Renieri, A. A., Bruttini, M. M., De Nigris, F. F., et al. (1995). Analysis of the OA1 gene reveals mutations in only one-third of patients with X-linked ocular albinism. *Human Molecular Genetics*, 4(12), 2319–2325.
- Schiaffino, M. V. M., Baschiroto, C. C., Pellegrini, G. G., Montalti, S. S., Tacchetti, C. C., De Luca, M. M., & Ballabio, A. A. (1996). The ocular albinism type 1 gene product is a membrane glycoprotein localized to melanosomes. *Pnas*, 93(17), 9055–9060.
- Schiaffino, M. V., & Tacchetti, C. (2005). The ocular albinism type 1 (OA1) protein and the evidence for an intracellular signal transduction system involved in melanosome biogenesis. *Pigment Cell Research*, 18(4), 227–233.
- Schiaffino, M. V. (2010). Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(7), 11–11.
- Schlüter, G. G., Steckel, M. M., Schiffmann, H. H., Harms, K. K., Viereck, V. V., Emons, G. G., et al. (2005). Prenatal DNA diagnosis of Noonan syndrome in a fetus with massive hygroma colli, pleural effusion and ascites. *Prenatal Diagnosis*, 25(7), 574–576.
- Schnur, R. E., Gao, M., Wick, P. A., Keller, M., Benke, P. J., Edwards, M. J., et al. (1998). OA1 Mutations and Deletions in X-Linked Ocular Albinism. *American Journal of Human Genetics*, 62(4), 10–10.

- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), e57.
- Schramm, T., Gloning, K. P., Minderer, S., Daumer-Haas, C., rtanagel, K. H., Nerlich, A., & Tutschek, B. (2009). Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 34(2), 160–170.
- Scott, M. C. M., Suzuki, I. I., & Abdel-Malek, Z. A. Z. (2002). Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Research*, 15(6), 433–439.
- Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2(7731), 971–972.
- Semina, E. V., Reiter, R., Leysens, N. J., Alward, W. L., Small, K. W., Datson, N. A., et al. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics*, 14(4), 392–399.
- Sharland, M. M., Burch, M. M., McKenna, W. M. W., & Paton, M. A. M. (1992). A clinical study of Noonan syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, 67(2), 178–183.
- Shields, M. B. M. (1983). Axenfeld-Rieger syndrome: a theory of mechanism and distinctions from the iridocorneal endothelial syndrome. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 81, 736–784.
- Shinawi, M., & Cheung, S. W. (2008). The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today*, 13(17-18), 760–770.
- Sillence, D. O. D., Senn, A. A., & Danks, D. M. D. (1979). Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics*, 16(2), 101–116.
- Simon, T. J., Bish, J. P., Bearden, C. E., Ding, L., Ferrante, S., Nguyen, V. Y., et al. (2005). A multilevel analysis of cognitive dysfunction and psychopathology associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome in children. *Development and Psychopathology*, 17 (03), 753–784.
- Simpson, J. L., & Elias, S. (2003). Genetics in obstetrics and gynecology, 3rd ed SIMPSON Joe Leigh, ELIAS Sherman: Librairie Lavoisier. New York: Marcel Decker, 305-20.
- Singhal, S. R., Agrawal, U., & Sharma, D. (2011). Outcome of gender bias: isolated bilateral upper limb amelia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India*, 61(4), 441–442.
- Slavotinek, A. M. (2011). Eye development genes and known syndromes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104(4), 448–456.
- Smith, D. W. D., Patau, K. K., Therman, E. E., & Inhorn, S. L. S. (1960). A new autosomal trisomy syndrome: multiple congenital anomalies caused by an extra chromosome. *The Journal of Pediatrics*, 57, 338–345.
- Snijders, R. J. R., Sebire, N. J. N., & Nicolaides, K. H. K. (1995). Maternal age and gestational age-specific risk for chromosomal defects. *Fetal Diagnosis and Therapy: Clinical Advances and Basic Research*, 10(6), 356–367.
- Snijders, R. J., Noble, P., Sebire, N., Souka, A., & Nicolaides, K. H. (1998). UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. *Lancet*, 352(9125), 4–4.
- Söhl, G. G., & Willecke, K. K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, 62(2), 5–5.

- Spencer, K. K., Heath, V. V., Flack, N. N., Ong, C. C., & Nicolaides, K. H. K. (2000). First trimester maternal serum AFP and total hCG in aneuploidies other than trisomy 21. *Prenatal Diagnosis*, 20(8), 635–639.
- Spritz, R. A. (1993). Molecular genetics of oculocutaneous albinism. *Seminars in Dermatology*, 12(3), 167–172.
- Spritz, R. A. (1994). Molecular genetics of oculocutaneous albinism. *Human Molecular Genetics*, 3 Spec No, 1469–1475.
- Spritz, R. A. R., Oh, J. J., Fukai, K. K., Holmes, S. A. S., Ho, L. L., Chitayat, D. D., et al. (1997). Novel mutations of the tyrosinase (TYR) gene in type I oculocutaneous albinism (OCA1). *Human Mutation*, 10(2), 171–174.
- Ståhl-Hallengren C, Ukkonen T, Kainulainen K, Kristofersson U, Saxne T, Tornqvist K & Peltonen L, (1994). An extra cysteine in one of the non-calcium-binding epidermal growth factor-like motifs of the FBN1 polypeptide is connected to a novel variant of Marfan syndrome. *The Journal of clinical investigation.*, 94(2):709-13
- Staleva, L., & Orlow, S. J. (2006). Ocular albinism 1 protein: trafficking and function when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Eye Research*, 82(2), 311–318.
- Stephens, K., Adam, M. P., Allanson, J. E., & Roberts, A. E. (2001). Noonan Syndrome - Nov 15 [Updated 2011 Aug 4]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
- Steiner, R. D., Pepin, M. G., & Byers, P. H. (2005). Osteogenesis imperfecta. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993
- Strungaru, M. H. M., Dinu, I. I., & Walter, M. A. M. (2007). Genotype-phenotype correlations in Axenfeld-Rieger malformation and glaucoma patients with FOXC1 and PITX2 mutations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(1), 228–237.
- Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genet*, 39(12):1443-52
- Sugar, H. S. H., Thompson, J. P. J., & Davis, J. D. J. (1966). The oculo-dento-digital dysplasia syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 61(6), 1448–1451.

T

- Tadokoro, T., Yamaguchi, Y., Batzer, J., Coelho, S. G., Zmudzka, B. Z., Miller, S. A., et al. (2005). Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(6), 1326–1332.
- Tanwar, M., Dada, T., & Dada, R. (2010). Axenfeld-Rieger Syndrome Associated with Congenital Glaucoma and Cytochrome *P4501B1* Gene Mutations. *Case Reports in Medicine*;2010. pii: 212656.
- Tartaglia, M. M., Kalidas, K. K., Shaw, A. A., Song, X. X., Musat, D. L. D., van der Burgt, I. I., et al. (2002). PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *American Journal of Human Genetics*, 70(6), 1555–1563.
- Tartaglia, M. M., & Gelb, B. D. B. (2005). Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Genomics and Human Genetics*, 6, 45–68.
- Tartaglia, M. M., Zampino, G. G., & Gelb, B. D. B. (2010). Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Molecular Syndromology*, 1(1), 2–26.

- Task Force members, Oakley, C., Chairperson, Child, A., Jung, B., Presbitero, P., et al. (2003). Expert consensus document on management of cardiovascular diseases during pregnancy. The Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases During Pregnancy of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 24, 761–781.
- Thomas, J. T. J., Kilpatrick, M. W. M., Lin, K. K., Erlacher, L. L., Lembessis, P. P., Costa, T. T., et al. (1997). Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nature Genetics*, 17(1), 58–64.
- Thomas D Gelehrter, M. D., Collins, F. S., & Ginsburg, D. (1998). *Principles of Medical Genetics*, 2e. Williams & Wilkins.
- Thornhill, A. R., deDie-Smulders, C. E., Geraedts, J. P., Harper, J. C., Harton, G. L., Lavery, S. A., et al. (2004). ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Human Reproduction*, 26(1):41-6.
- Tischkowitz, M. D. M., & Hodgson, S. V. S. (2003). Fanconi anaemia. *Journal of Medical Genetics*, 40(1), 1–10.
- Tjeldhorn L, Rand-Hendriksen S, Gervin K, Brandal K, Inderhaug E, Geiran O & Paus B (2006). Rapid and efficient FBN1 mutation detection using automated sample preparation and direct sequencing as the primary strategy. *Genetic Testing*, 10(4):258-64
- Tjio, J. H. (1978). The chromosome number of man. *Hereditas* 42,1–6.
- Tompson, S., Ruiz-Perez, V. L., Blair, H. J., & Barton, S. (2007). Sequencing EVC and EVC2 identifies mutations in two-thirds of Ellis–van Creveld syndrome patients. *Human Genetics*, 120(5):663-70.
- Tongsong, T. T., Wanapirak, C. C., & Sirianguk, S. S. (1998). Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta type II. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 61(1), 33–38.
- Torrent-Farnell, J., & Morros, R. (2001). The EU challenges on the designation of orphan medicinal products. *Pharmaceuticals Policy and Law*. 19–30. IOS Press
- Torres, E. M. E., Williams, B. R. B., & Amon, A. A. (2008). Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics*, 179(2), 737–746.
- Torres-Juan, L., Rosell, J., Morla, M., Vidal-Pou, C., García-Algas, F., la Fuente, de, M.-A., et al. (2007). Mutations in TBX1 genocopy the 22q11.2 deletion and duplication syndromes: a new susceptibility factor for mental retardation. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 15 (6), 658–663.
- Tripathi, R. K., Giebel, L. B., Strunk, K. M., & Spritz, R. A. (1991). A polymorphism of the human tyrosinase gene is associated with temperature-sensitive enzymatic activity. *Gene Expression*, 1(2), 103–110.
- Tripathi, R. K., Strunk, K. M., Giebel, L. B., Weleber, R. G., & Spritz, R. A. (1992). Tyrosinase gene mutations in type I (tyrosinase-deficient) oculocutaneous albinism define two clusters of missense substitutions. *American Journal of Medical Genetics*, 43(5), 865–871.
- Tsui, N. B. Y. N., Kadir, R. A. R., Chan, K. C. A. K., Chi, C. C., Mellars, G. G., Tuddenham, E. G. E., et al. (2011). Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood*, 117(13), 3684–3691.
- Tümer, Z. Z., & Bach-Holm, D. D. (2009). Axenfeld-Rieger syndrome and spectrum of PITX2 and FOXC1 mutations. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 17(12), 1527–1539.
- Tunca, Y., Kadandale, J. S., & Pivnick, E. K. (2001). Long-term survival in Patau syndrome. *Clinical Dysmorphology*, 10(2), 149–150.

Turner, H. H. (1938). A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*. 23(5), 566–574.

U

Uhlmann, W. R., Schuette, J. L., & Yashar, B. (2011). A Guide to Genetic Counseling, 2nd ed. New York: Wiley-Blackwell.

V

Valencia, M., Lapunzina, P., Lim, D., Zannolli, R., Bartholdi, D., Wollnik, B., et al. (2009). Widening the mutation spectrum of EVC and EVC2: ectopic expression of Weyer variants in NIH 3T3 fibroblasts disrupts hedgehog signaling. *Human Mutation*, 30(12), 1667–1675.

van den Berg, M. M. J. M., van Maarle, M. C. M., van Wely, M. M., & Goddijn, M. M. (2012). Genetics of early miscarriage. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1822(12), 1951–1959.

van der Burgt, I. I., Berends, E. E., Lommen, E. E., van Beersum, S. S., Hamel, B. B., & Mariman, E. E. (1994). Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 53(2), 187–191.

van der Burgt, I. I., & Brunner, H. H. (2000). Genetic heterogeneity in Noonan syndrome: evidence for an autosomal recessive form. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 94(1), 46–51.

van der Burgt, I. I. (2007). Noonan syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2, 4–4.

van Dijk, F. S., Nesbitt, I. M., Zwikstra, E. H., Nikkels, P. G., Piersma, S. R., Fratantoni, S. A., et al. (2009). PPIB Mutations Cause Severe Osteogenesis Imperfecta. *American Journal of Human Genetics*, 85(4), 521–527.

Varela, M. M., & Ramos, C. C. (1996). Chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Creveld syndrome): a case report. *European Journal of Orthodontics*, 18(4), 313–318.

Veltman, J. A., & Brunner, H. G. (2012). De novo mutations in human genetic disease. *Nature Reviews Genetics*. 13(8):565-75.

Venkat-Raman, N., Sebire, N. J., Murphy, K. W., Carvalho, J. S., & Hall, C. M. (2005). Increased first-trimester fetal nuchal translucency thickness in association with chondroectodermal dysplasia (Ellis-Van Creveld syndrome). *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 25(4), 412–414.

Vincent A., Billingsley G. Priston, M., Williams-Lyn, D., & Sutherland, J. (2001). Phenotypic heterogeneity of CYP1B1: mutations in a patient with Peters' anomaly. *J Med Genet*. 2001; 38(5), 324–326.

W

- Wafaei, J. R., & Choy, F. Y. (2004). Glucocerebrosidase recombinant allele: Molecular evolution of the glucocerebrosidase gene and pseudogene in primates. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), 277–285.
- Warman, M. L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Lachman, R., LeMerrer, M., et al. (2011). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(5), 943–968.
- Wei, A., Wang, Y., Long, Y., Wang, Y., Guo, X., Zhou, Z., et al. (2010). A comprehensive analysis reveals mutational spectra and common alleles in Chinese patients with oculocutaneous albinism. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(3), 716–724.
- Wei, A., Yang, X., Lian, S., & Li, W. (2011). Implementation of an optimized strategy for genetic testing of the Chinese patients with oculocutaneous albinism. *Journal of Dermatological Science*, 62(2), 4–4.
- Wei, A. H., Zang, D. J., Zhang, Z., Liu, X. Z., & He, X. (2013a). Exome Sequencing Identifies *SLC24A5* as a Candidate Gene for Nonsyndromic Oculocutaneous Albinism. *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1038/jid.2013.49.
- Wei, A.-H., Yang, X.-M., Lian, S., & Li, W. (2013b). Genetic analyses of Chinese patients with digenic oculocutaneous albinism. *Chinese Medical Journal*, 126(2), 226–230.
- Wenstrom, K. D. K., Chu, D. C. D., Owen, J. J., & Boots, L. L. (1998). Maternal serum @a-fetoprotein and dimeric inhibin A detect aneuploidies other than Down syndrome. *Ymob*, 179(4), 5–5.
- Wilkie, A. O. M. A. (2002). Why study human limb malformations? *Journal of Anatomy*, 202(1), 27–35.
- Wilson, J. G. (1973). *Environment and birth defects*. Academic Pr. New York:Academic Press
- Wilson, P. D. P., Loffredo, C. A. C., Correa-Villaseñor, A. A., & Ferencz, C. C. (1998). Attributable fraction for cardiac malformations. *American Journal of Epidemiology*, 148(5), 414–423.
- Witecka, J. J., Auguściak-Duma, A. M. A., Kruczek, A. A., Szydło, A. A., Lesiak, M. M., Krzak, M. M., et al. (2008). Two novel COL1A1 mutations in patients with osteogenesis imperfecta (OI) affect the stability of the collagen type I triple-helix. *Journal of Applied Genetics*, 49(3), 283–295.
- Witkop, C. J. (1979). Albinism: hematologic-storage disease, susceptibility to skin cancer, and optic neuronal defects shared in all types of oculocutaneous and ocular albinism. *The Alabama Journal of Medical Sciences*, 16(4), 327–330.

Y

- Yamanaka, M., Setoyama, T., & Igarashi, Y. (2006). Pregnancy outcome of fetuses with trisomy 18 identified by prenatal sonography and chromosomal analysis in a perinatal center. *Am J Med Genet A*, 140(11):1177-82.
- Yang, S. S., Langer, L. O., Cacciarelli, A., Dahms, B. B., Unger, E. R., Roskamp, J., et al. (1987). Three conditions in neonatal asphyxiating thoracic dysplasia (Jeune) and short rib-polydactyly syndrome spectrum: A clinicopathologic study. *American Journal of Medical Genetics*, 28 (S3), 191–207.
- Ye, X. X., Song, G. G., Fan, M. M., Shi, L. L., Jabs, E. W. E., Huang, S. S., et al. (2006). A novel heterozygous deletion in the EVC2 gene causes Weyers acrofacial dysostosis. *Human Genetics*, 119(1-2), 199–205.
- Yeo, L., Waldron, R., Lashley, S., Day-Salvatore, D., & Vintzileos, A. M. (2003). Prenatal sonographic findings associated with nonmosaic trisomy 9 and literature review. *Journal of Ultrasound in Medicine : Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 22(4), 425–430.
- Yunis, J. (1976). High resolution of human chromosomes. *Science*, 191(4233), 1268–1270.

Z

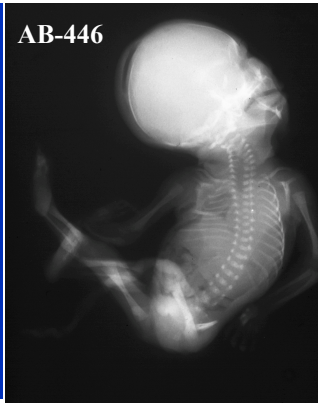
- Zakin, L., Reversade, B., Kuroda, H., Lyons, K. M., & De Robertis, E. M. (2005). Sirenomelia in Bmp7 and Tsg compound mutant mice: requirement for Bmp signaling in the development of ventral posterior mesoderm. *Development*, 132(10), 2489–2499.
- Zaragoza, M. V. M., Jacobs, P. A. P., James, R. S. R., Rogan, P. P., Sherman, S. S., & Hassold, T. T. (1994). Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Human Genetics*, 94(4), 411–417.
- Zaragoza, M. V., Lewis, L. E., Sun, G., Wang, E., Li, L., Said-Salman, I., et al. (2004). Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal. *Gene*, 330, 9–18.
- Zenker, M. M., Buheitel, G. G., Rauch, R. R., Koenig, R. R., Bosse, K. K., Kress, W. W., et al. (2004). Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 144(3), 7–7.
- Zweier, C., Sticht, H., Aydin-Yaylagül, I., Campbell, C. E., & Rauch, A. (2007). Human TBX1 Missense Mutations Cause Gain of Function Resulting in the Same Phenotype as 22q11.2 Deletions. *American Journal of Human Genetics*, 80(3), 8–8.

ANEXOS

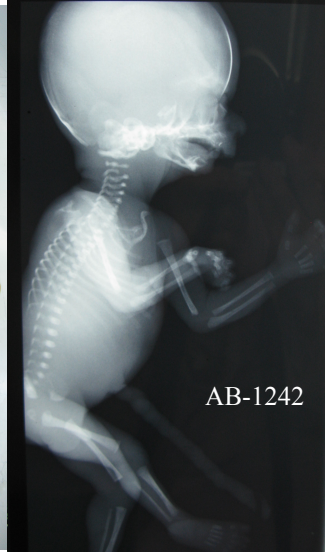
ANEXO I: ABORTOS SIN CARACTERIZAR



AB-446



AB-1123



AB-1242



AB-1239



AB-1289



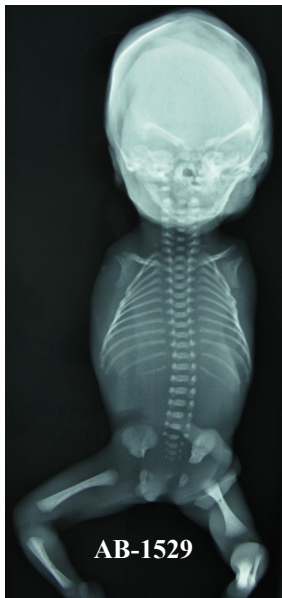
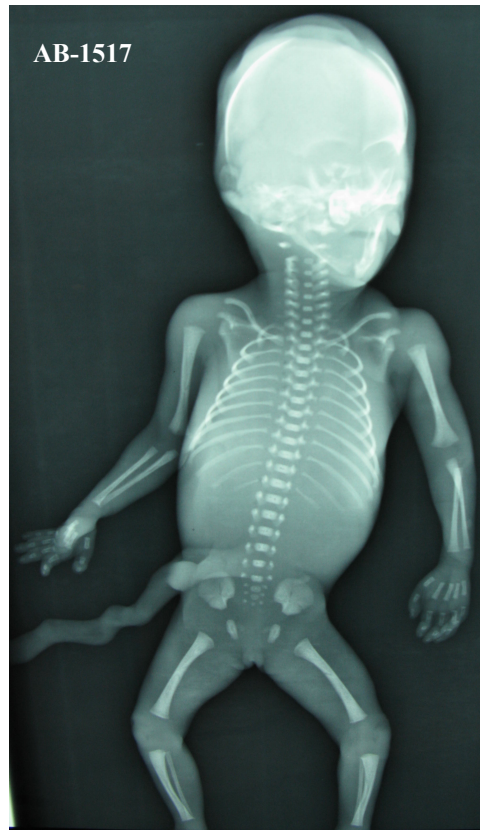
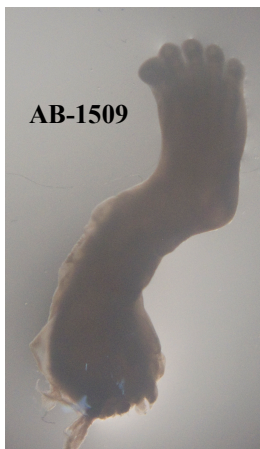
AB-1330

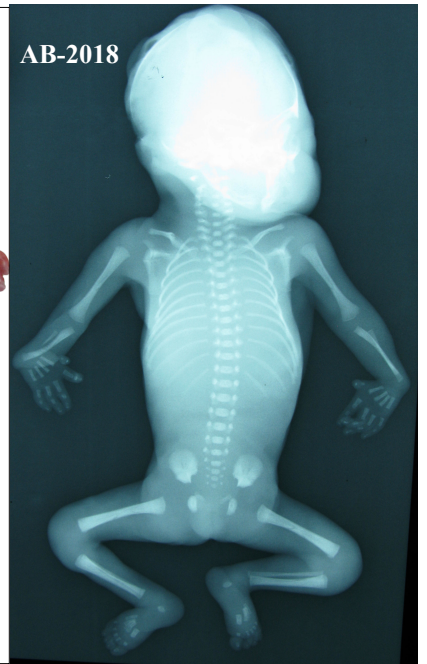
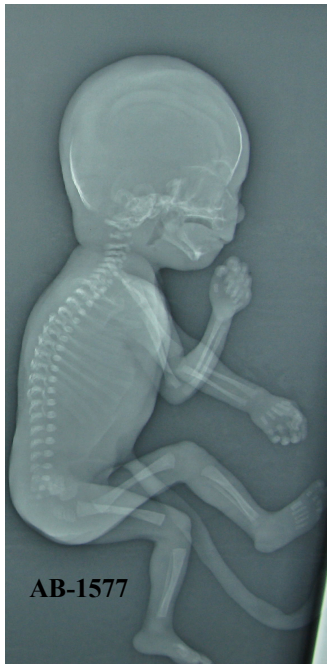


AB-1379



AB-1379





ANEXO II: MODELO DE HISTORIA CLÍNICA

HISTORIA CLÍNICA DEFECTOS CONGÉNITOS

Datos personales:

-Paciente

1er apellido:	Dirección:
2º apellido:	Fecha de Nacimiento: 00/00/00
Nombre:	Lugar de Nacimiento paciente: (Población/provincia/País)
Nº Historia Clínica:	Nacionalidad: (en el caso de doble indicar ambas)
NºADN	
Nº Familia	Lugar de Nacimiento de familiares
Profesión:	Estado civil:

(Nota: en caso de resto abortivo poner datos de la madre e indicar FUR: 00/00/00)

-Madre

1er apellido:	Dirección:
2º apellido:	Fecha de Nacimiento: 00/00/00
Nombre:	Edad: <i>(en caso de pacientes de China adecuar a la Española)</i>
Nº Historia Clínica:	Lugar de Nacimiento paciente: (Población/provincia/País)
	Nacionalidad: (en el caso de doble indicar ambas)
NºADN:	
Nº Familia:	Lugar de Nacimiento de familiares
Profesión:	Estado civil:

(Nota: en caso de resto abortivo rellenar datos en paciente)

-Padre

1er apellido:	Dirección:
2º apellido:	Fecha de Nacimiento: 00/00/00
Nombre:	*Edad: <i>(en caso de pacientes de China adecuar a la Española)</i>
Nº Historia Clínica:	Lugar de Nacimiento paciente: (Población/provincia/País)
	Nacionalidad: (en el caso de doble indicar ambas)
NºADN:	
Nº Familia:	Lugar de Nacimiento de familiares
Profesión:	Estado civil:

*(*Nota: en caso de resto abortivo es imprescindible la edad)*

Datos del Clínico:

Nombre y apellidos
 Nº de colegiado:
 Sospecha clínica del paciente:
 Fecha de realización de consulta: 00/00/00
 Enviado por: (indicar nombre y apellidos profesional, datos de contacto, disciplina a la que pertenece y lugar de ubicación del servicio)

Fdo, *(Firma y escritura de nombre completo debajo)*

Sello del servicio y Logo del hospital

HISTORIA CLÍNICA DEFECTOS CONGÉNITOS

1-Historia del Embarazo: *(En el caso de que la paciente presente historia ecográfica se le solicitará una copia de los documentos al clínico y se adjuntarán a la presente historia clínica)*

1.1- ¿Ha existido alguna complicación en el embarazo? Sí ☐; No ☐ *(En caso afirmativo indicar cuál). En caso de aborto rellenar además sección 3.*

1.2-¿Padece algún tipo de enfermedad? Sí ☐; No ☐ *(En caso afirmativo indicar cuál)*

1.2.1 ¿Padece alguna enfermedad crónica diagnosticada antes del embarazo? Sí ☐; No ☐
*(En caso afirmativo indicar cuál) ¿Qué medicación ha tomado para paliarla?*_____

1.2.2 ¿Ha tomado algún tipo de medicación antes del embarazo que luego haya necesitado seguir tomando? Sí ☐; No ☐ *(En caso afirmativo indicar cuál)*_____

1.2.3 ¿Padece algún tipo de sintomatología de corta duración durante la gestación tipo: diabetes, fiebre, resfriados, infecciones? Sí ☐; No ☐ *(En caso afirmativo indicar cuál) ¿Qué medicación ha tomado para paliarla?*_____

1.2.4 Durante el embarazo, ¿ha acudido al dentista? ¿Le han tomado alguna radiografía bucal? ¿Ha padecido alguna infección bucal? ¿Tomó algún antibiótico u otro tipo de medicación? Sí ☐; No ☐ *(En caso afirmativo indicar cuál)*_____

1.3 - En general ha tenido alguno de los siguientes hábitos durante el embarazo: cafeína, tabaco, alcohol (cerveza, vino, otras bebidas alcohólicas), etc.? Sí ☐; No ☐ *(En caso afirmativo indicar cantidad y frecuencia)*

1.3.2 ¿Cuántos cigarros ha fumado al día?:

- ☐ 1-5 cigarros al día
- ☐ 5-10 cigarros al día
- ☐ 10-20 cigarros al día
- ☐ >20 cigarros al día
- ☐ los fines de semanas (indicar cantidad)

1.3.1 ¿Cuántos vasos ha bebido al día?

- ☐ 1-3 vasos de vino, cerveza u otras bebidas con contenido alcohólico al día
- ☐ 3-5 vasos de vino, cerveza u otras bebidas con contenido alcohólico al día
- ☐ >5 vasos de vino, cerveza u otras bebidas con contenido alcohólico al día
- ☐ los fines de semanas (indicar cantidad)

Responder a la siguiente pregunta solo cuando en la pregunta 1.3 la respuesta sea negativa:

1.3.3 ¿Ha tomado algo de alcohol o fumado entre la 1ª semana de gestación y la 8ª semana de gestación? ¿Vasos de vino esporádicos después de la comida?

1.4 - ¿Ha empleado algún tipo de cosmético durante el embarazo?

Sí ☐ (indicar cual) _____
No ☐

1.5 ¿Qué ocupación laboral ha tenido durante el embarazo? ¿Con qué materiales ha trabajado?

1.6-En cuanto a la historia Obstétrica: ¿Cuándo notó los primeros movimientos fetales?. (Indicar intensidad)_____

1.7-¿Es el primer embarazo?.

Sí ☐;
No ☐ (indicar número de embarazos totales y número de descendientes)_____

1.8 ¿El embarazo ha sido espontaneo o por reproducción asistida?

- ☐ Embarazo espontáneo
- ☐ Embarazo por reproducción asistida

2-Historia del parto:

2.1 ¿El embarazo ha ido a término? Sí ☐; No ☐ **En caso de aborto ir a sección 3.**

2.2 ¿El parto ha sido espontáneo o inducido?

- ☐ Parto espontáneo
- ☐ Parto inducido ¿por qué? _____

2.3 En caso de parto espontáneo, ¿Parto hospitalario o domiciliario?

- ☐ Parto hospitalario
- ☐ Parto domiciliario

2.4 En caso de Parto hospitalario, ¿Parto normal o cesárea?

- ☐ Parto normal
- ☐ Parto por cesárea, ¿por qué? _____

2.5 ¿En qué posición ha nacido el feto: transversa, podálica, etc?

2.6 Mediciones fetales (indicar percentiles):

Peso_____

LCR_____

Perímetro cefálico_____

Test de APGAR:_____

2.7 ¿Necesitó incubadora el neonato?:

2.8 ¿Necesitó el neonato algún tipo de reanimación?:

3-Historia del aborto:

3.1 ¿El aborto es espontáneo o interrupción voluntaria del embarazo (I.V.E.)?

☐ Aborto espontáneo ¿Semanas de gestación? _____
☐ I.V.E ¿Semanas de gestación? _____

3.2 En caso de aborto espontáneo ¿Es el primer caso en la gestante?

Sí ☐;
No ☐ (indicar número) _____

3.3 En caso de aborto espontáneo ¿hay más casos en la familia?

Sí ☐ (indicar el/los familiar/es y el número) _____
No ☐

3.4 En caso I.V.E ¿Es el primer caso en la gestante?

Sí ☐;
No ☐ (indicar número) _____

3.5 En caso I.V.E ¿el feto presentaba malformaciones congénitas?

Sí ☐; (indicar cual) _____ *Adjuntar informe detallado.*
No ☐

3.6 En caso I.V.E ¿ha habido otros casos de I.V.E por malformaciones congénitas en la familia?

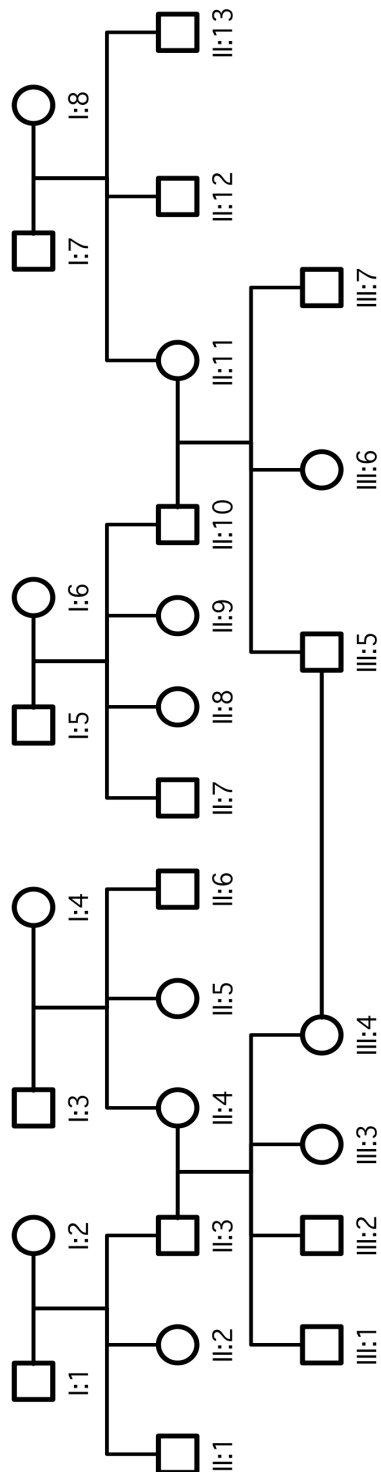
Sí ☐; (indicar cual) _____
No ☐

4-Otros comentarios:

5-Exploración física:

5-Árbol Genealógico:

(Nota indicar si existe consanguinidad o endogamia y particularidades de apellidos o matices de la propia cultura)



6-Estudios a Realizar:

☐ Estudios citogenéticos:

- ☐ Cariotipo
- ☐ FISH

☐ Estudios moleculares:

- ☐ QF-PCR
- ☐ MLPA:
- ☐ Microarrays:
- ☐ Microsatélites
- ☐ PCR

☐ Evaluación morfológica radiológica:

☐ Evaluación anatomopatológica:

☐ Otros estudios

7-Diagnóstico diferencial:

ANEXO III: SONDAS DE MLPA MRC-HOLLAND

SALSA MLPA P029-B1 WBS probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	ELN	7q11.23
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
132 *	Reference probe 00797-L21698	5q31		
142 *	HSPB1 probe 09538-L09961			Exon 1
148 *	HSPB1 probe 09540-L09963			Exon 3
154 *	Reference probe 14924-L16657	6q22		
160 *	ELN probe 17573-L21523		Exon 4	
166 *	Reference probe 15865-L18430	2p16		
171 ‡	FKBP6 probe 01629-L21865			Exon 9
178 *	POR probe 13768-L21866			Exon 11
184 *	FZD9 probe 17574-L21867			Exon 1
192 *	ELN probe 17575-L21525		Exon 16	
197 *	Reference probe 05525-L04953	20q13		
202	Reference probe 01116-L00620	8q21		
208 *	HSPB1 probe 09539-L09962			Exon 2
214 *	LIMK1 probe 17576-L21868			Exon 14
221 *	STX1A probe 17577-L21869			Exon 3
227 *	LIMK1 probe 08235-L21870			Exon 10
234 *	TBL2 probe 17578-L21872			Exon 2
247 *	CLIP2 probe 17580-L21530			Exon 10
254 *	Reference probe 08718-L08729	9q21		
261 *	ELN probe 17579-L21529		Exon 9	
274 *	STX1A probe 17582-L21880			Exon 7
281 *	LIMK1 probe 17584-L21534			Exon 2
287 *	Reference probe 03926-L20793	15q21		
293 *	ELN probe 17583-L21881		Exon 26	
308 *	ELN probe 16350-L21883		Exon 27	
316 ‡	ELN probe 01333-L21882		Exon 1	
323 *	ELN probe 17585-L21884		Exon 3	
330 *	RFC2 probe 17586-L21885			Exon 10
337 ‡	ELN probe 01334-L21886		Exon 6	
346	ELN probe 01335-L00879		Exon 33	
355 *	POR probe 12692-L13770			Exon 12
364 *	Reference probe 06489-L06015	1p13		
373 ‡	ELN probe 01336-L21887		Exon 20	
382 *	TBL2 probe 17587-L21537			Exon 7
390 ‡	LIMK1 probe 01337-L21889			Exon 5
398 *	CLIP2 probe 17588-L21888			Exon 4
407 *	RFC2 probe 17589-L21890			Exon 3
418	CLIP2 probe 01339-L00885			Exon 14
427	Reference probe 07817-L07547	3p22		

* New in version B1 (from lot B1-1211 onwards).

‡ Changed in version B1 (from lot B1-1211 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

Note: Exon numbering used here may differ from literature! Please notify us of any mistakes. The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

SALSA MLPA P036-E1 Human Telomere-3 probemix

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130 §	1p	TNFRSF4	02269-L01761	01-001.14
136	2p	ACP1	02274-L08758	02-000.25
142	3p	CHL1	01721-L01329	03-000.34
151	4p	PIGG (FLJ20265)	02005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	01723-L01327	05-000.37
166	6p	IRF4	01724-L02048	06-000.34
172	7p	ADAP1 (CENTA1)	02275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	02397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	01727-L02050	09-000.84
193	10p	DIP2C (KIAA0934)	02277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC8A (RIC-8)	03315-L02733	11-000.20
208	12p	SLC6A12	02276-L01767	12-000.17
219 +	13q-cen	PSPC1	02399-L01847	13-019.24 (Acrocentric chromosome)
227 +	14q-cen	CCNB1IP1 (HEI10)	01732-L01318	14-019.86 (Acrocentric chromosome)
235 +	15q-cen	MKRN3	07291-L08858	15-021.36 (Acrocentric chromosome)
242	16p	POLR3K	01734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	01735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	01736-L02051	18-000.19
265	19p	CDC34	01737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	02396-L01844	20-000.26
283 +	21q-cen	RBM11	01739-L01311	21-014.51 (Acrocentric chromosome)
289 +	22q-cen	BID	01740-L01310	22-016.61 (Acrocentric chromosome)
298	Xp/Yp (PAR1)	SHOX	01148-L01331	X/Y-000.52 (PAR1 region)
307	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	02392-L02149	01-247.08 (0.2 Mb from telomere)
313	2q	CAPN10	01742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH1	02013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330 §	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2.0 Mb from telomere)
337	5q	GNB2L1	03319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	01746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
355	7q	VIPR2	01747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
361	8q	ZC3H3 (KIAA0150)	01748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
372	9q	EHMT1	08205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
379	10q	PAOX (PAO)	09142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	NCAPD3 (KIAA0056)	01751-L01299	11-133.60 (1.2 Mb from telomere)
395	12q	ZNF10	02687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	01753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
411	14q	MTA1	02778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418	15q	ALDH1A3	01755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS8 (GAS11)	03201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	01757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
441	18q	RBFA (C18orf22)	01758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450	19q	CHMP2A (BC-2)	09143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458	20q	OPRL1	02688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	PRMT2 (HMT1)	02586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
475	22q	RABL2B	01762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
483	Xq/Yq (PAR2)	VAMP7 (SYBL1)	01763-L02150	X/Y-154.78 (PAR2; 0.1 Mb from telom.)

Many notes on individual probes are present on page 7 and 8.

§ New in version E1 (from lot E1-0808 onwards)

+ The 13, 14, 15, 21 & 22 q-cen probes target the q arm close to the centromer (acrocentric chromosomes).

SALSA MLPA P054-B1 FOXL2-TWIST1 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position				
		Reference	TWIST1	FOXL2	GPR143	Other
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA					
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation					
100	X-fragment: Specific for the X chromosome					
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome					
127 *	Reference probe 00797-L00093	5q31				
134 *	Reference probe 08103-L09463	11p15				
148	FOXC1 probe 02561-L02029					6p25
157	GPR143 probe 02974-L02405				Exon 6	
166	PITX2 probe 02978-L02409					4q25
172 *	Reference probe 11570-L12317	2p13				
178 ¥	GPR143 probe 02972-L16214				Exon 3	
184	FOXL2 probe 01943-L01489			Exon 1		
190 *	Reference probe 08181-L08061	10p13				
196 ¥	TWIST1 probe 02079-L15512		Exon 2			
202	TWISTNB probe 02146-L01642		7p15.3			
211	FOXL2 probe 01944-L01490			Exon 1		
220	GPR143 probe 02975-L02406				Exon 9	
229	TWISTNB probe 02147-L01963		7p15.3			
238	FOXL2 probe 01945-L01491			Exon 1		
250 ¥	TWIST1 probe 04916-L16215		Upstream			
256	ATR probe 02557-L02020					Exon 4
265	GPR143 probe 02565-L02026				Exon 2	
272 *	Reference probe 06346-L05861	1p21				
279 ¥	TWIST1 probe 02080-L16218		Promoter			
286 ¥	GPR143 probe 03134-L16217				Exon 1	
293 ¥	TWIST1 probe 01166-L16216		Exon 2			
301	ATR probe 02558-L02021					Exon 22
310 *	Reference probe 12082-L15409	15q11				
319	TWIST1 probe 01969-L02364		Exon 1			
328 ¥ ±	GPR143 probe 02566-L10170				Exon 4	
337 ‡	PITX2 probe 02976-L02407					4q25
346	TWIST1 probe 04915-L04301		Upstream			
355	FOXC2 probe 02563-L02024					16q24
363	PITX2 probe 03136-L02887					4q25
373	ATR probe 02560-L02023					Exon 47
382	FOXC1 probe 02562-L02030					6p25
391 *	Reference probe 04837-L04221	5p13				
400	GPR143 probe 02567-L02028				Exon 8	
407	FOXC2 probe 02564-L02025					16q24
418	GPR143 probe 03135-L02404				Exon 5	
427 *	GPR143 probe 14491-L16219				Exon 7	
436 *	Reference probe 05426-L04836	17q21				

* New in version B1-0909.

¥ Changed in version B1 (from lot B1-0909 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

± More variable. This probe has a high standard deviation.

Please note that the GPR143 gene is located on the X-chromosome.

‡ SNP rs61756183 could influence the probe signal. In case of apparent deletions, it is recommended to sequence the region targeted by this probe.

SALSA MLPA P065-A2 Marfan probemix-1

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	FBN1	TGFBR2
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 03896-L00020	11q13		
136	Reference probe 01662-L01237	11q23		
142 †	FBN1 probe 04513-L14408		Exon 1	
148	FBN1 probe 03922-L03377		Exon 24	
154	FBN1 probe 03931-L03386		Exon 46	
160	Reference probe 00822-L00130	2p21		
166	FBN1 probe 03914-L03369		Exon 3	
172	TGFBR2 probe 02797-L06029			Exon 7
178	FBN1 probe 03923-L03378		Exon 25	
184	FBN1 probe 03930-L03385		Exon 42	
190	FBN1 probe 03915-L03370		Exon 6	
196	TGFBR2 probe 03861-L03610			Exon 2
202	Reference probe 02654-L02121	11q23		
208	FBN1 probe 03924-L03379		Exon 26	
214	FBN1 probe 03932-L03387		Exon 47	
223	TGFBR2 probe 03862-L03611			Exon 3
230	FBN1 probe 04336-L03964		Exon 12	
238	FBN1 probe 03925-L03380		Exon 30	
247	Reference probe 02478-L01971	1q21		
256	TGFBR2 probe 03863-L03246			Exon 4
265	FBN1 probe 03933-L03388		Exon 50	
274	FBN1 probe 03917-L03372		Exon 14	
283	FBN1 probe 03926-L03381		Exon 31	
292	TGFBR2 probe 03864-L03247			Exon 5
301 *	Reference probe 01916-L01460	1q22		
310	FBN1 probe 03934-L03389		Exon 53	
319	FBN1 probe 03918-L03373		Exon 15	
328	TGFBR2 probe 03865-L03248			Exon 6
337	FBN1 probe 03927-L03382		Exon 34	
343	FBN1 probe 04337-L03390		Exon 56	
355 *	Reference probe 04702-L04080	1p36		
364	DUT probe 06501-L06051	15q21		
373	FBN1 probe 03919-L03374		Exon 18	
382	TGFBR2 probe 02795-L02180			Exon 1
391	FBN1 probe 03928-L03383		Exon 36	
400 †	TGFBR2 probe 04665-L14635	3p24		Exon 1
409	FBN1 probe 03936-L03751		Exon 62	
418	FBN1 probe 03920-L03375		Exon 19	
427	FBN1 probe 03929-L03750		Exon 40	
436	Reference probe 03761-L02477	5p25		
445	FBN1 probe 03937-L03392		Exon 63	
454	FBN1 probe 03921-L03376		Exon 21	
463	Reference probe 03058-L02495	4p16		

* New in version A2 (from lot 0109 onwards).

† Changed in version A2. Small change in length and/or peak height. No change in sequence detected.

Note: Exon numbering might be different as compared to literature! Please notify us of any mistakes. The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

SALSA MLPA P066-A2 Marfan probemix-2

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		Reference	FBN1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	Reference probe 00797-L00463	5q31	
136	Reference probe 01819-L01384	16p13	
142	FBN1 probe 02447-L01891		Exon 1
148	FBN1 probe 02463-L01907		Exon 35
154	FBN1 probe 02448-L01892		Exon 2
160	FBN1 probe 02464-L01908		Exon 38
166	Reference probe 01565-L01137	22q12	
172	FBN1 probe 02449-L01893		Exon 4
178	FBN1 probe 02465-L01909		Exon 41
184	FBN1 probe 02450-L01894		Exon 5
190	FBN1 probe 02466-L01910		Exon 43
196	Reference probe 02131-L02591	3p25	
202	FBN1 probe 02451-L01895		Exon 6
211	FBN1 probe 02467-L01911		Exon 44
220	FBN1 probe 02452-L01896		Exon 7
229	FBN1 probe 02775-L01919		Exon 60
238	Reference probe 02591-L02062	5q35	
247	FBN1 probe 02453-L01897		Exon 8
256	FBN1 probe 02469-L01913		Exon 49
265	FBN1 probe 02454-L01898		Exon 9
274	FBN1 probe 02470-L01914		Exon 52
283	Reference probe 02414-L01860	16q22	
292	FBN1 probe 02773-L01906		Exon 33
301	FBN1 probe 02471-L01915		Exon 54
310	FBN1 probe 02456-L01900		Exon 13
319	FBN1 probe 02472-L01916		Exon 55
328	Reference probe 01918-L01462	1q21	
337	FBN1 probe 02457-L01901		Exon 16
346	FBN1 probe 02473-L01917		Exon 57
364	FBN1 probe 02474-L01918		Exon 58
373	Reference probe 02183-L01681	6q26	
382	FBN1 probe 02459-L01903		Exon 23
391	FBN1 probe 02774-L01912		Exon 45
400	FBN1 probe 02460-L01904		Exon 28
409	FBN1 probe 02476-L01920		Exon 64
418	Reference probe 01842-L01407	16p13	
427	FBN1 probe 02461-L01905		Exon 29
436	FBN1 probe 02477-L01921		Exon 65
445	FBN1 probe 02772-L01902		Exon 17
454	Reference probe 01810-L00984	5q22	
463	Reference probe 01800-L01364	13q14	

Note: Exon numbering might be different as compared to literature! Please notify us of any mistakes. The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

SALSA MLPA P070-B2 Human Telomere-5 probemix

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation (autosomal)			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene ; X-111.95)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene ; Y-013.98)			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (DDX3Y gene ; Y-013.54)			
132	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	04084-L03605	01-247.08
139	2q	ATG4B (=APG4B)	02781-L03168	02-242.25
145	3q	KIAA0226	02690-L02842	03-198.88
152	4q	FRG1	02691-L02843	04-191.10
160	5q	GNB2L1	02790-L02232	05-180.60
166	6q	TBP	02694-L02844	06-170.71
172	7q	VIPR2	02793-L03167	07-158.63
179	8q	RECQL4	02695-L00610	08-145.71
186	9q	EHMT1	02792-L02846	09-139.78
193	10q	ECHS1	02696-L02847	10-135.03
202	11q	IGSF9B (=KIAA1030)	02697-L02848	11-133.29
211	12q	ZNF10	02686-L02849	12-132.24
218	13q	CDC16	02698-L00753	13-114.03
226	14q	MTA1	02699-L02850	14-104.99
233	15q	TM2D3 (=FLJ22604)	02701-L02851	15-100.01
241	16q	GAS8 (=GAS11)	02702-L00734	16-088.64
250	17q	SECTM1	02703-L03169	17-077.87
258	18q	CTDP1	02704-L03607	18-075.58
265	19q	CHMP2A (=BC-2)	02705-L02853	19-063.76
274	20q	UCKL1 (=FLJ20517)	02706-L00642	20-062.05
281	21q	S100B	02587-L02854	21-046.85
290	22q	ARSA	02707-L00661	22-049.41
298	X/Yq (PAR2)	VAMP7 (=SYBL1)	02708-L02855	X-154.82 + Y-057.68 (PAR region)
306	1p	TNFRSF18	02270-L01762	01-001.13
315	2p	ACP1	02709-L02856	02-000.27
323	3p	CHL1	02896-L02363	03-000.34
329	4p	PIGG	14440-L16146	04-000.51
337	5p	CCDC127 (=LOC133957)	02791-L02233	05-000.26
346	6p	IRF4	04077-L03462	06-000.34
355*	7p	SUN1 (UNC84A)	02780-L02857	07-000.84
362	8p	FBXO25	02715-L00973	08-000.40
370	9p	DOCK8 (=FLJ00026)	02716-L00688	09-000.38
379	10p	ZMYND11 (=BS69)	05180-L16343	10-000.22
387	11p	BET1L	02784-L02226	11-000.20
393*	12p	KDM5A (JARID1A (=RBBP2))	02787-L02229	12-000.29
402 +	"13p"	PSPC1	02717-L03608	13-019.25 (Acrocentric)
409 +	"14p"	PARP2 (=ADPRTL2)	02718-L00732	14-019.90 (Acrocentric)
418 +	"15p"	NDN	04026-L01542	15-021.48 (Acrocentric)
427	16p	DECR2	02720-L00648	16-000.40
436	17p	RPH3AL	04081-L03465	17-000.18
444	18p	THOC1	02789-L02231	18-000.20
450	19p	PPAP2C	03501-L02880	19-000.23
459	20p	ZCCHC3 (=FLJ22115)	02723-L00641	20-000.23
466 +	"21p"	HSPA13 (=STCH)	02724-L00334	21-014.68 (Acrocentric)
479 +	"22p"	IL17RA	02725-L16344	22-015.96 (Acrocentric)
484	X/Yp (PAR1)	SHOX	03714-L16345	X/Y-000.52 (PAR region)

+ The 13, 14, 15, 21 & 22 "p" probes in fact target the q arm, as these chromosomes are acrocentric. The lengths of some probes in this description have been adjusted as compared to previous versions.

Please read all notes on p. 7, 8 critically!

* From version 35 onwards gene name has changed. You can find the previously used gene names between brackets.

SALSA MLPA P179-B1 Limb-1 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position			
		reference	GLI3	HOXD13	ROR2
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA				
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation				
100	X-fragment: Specific for the X chromosome				
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome				
130	Reference probe 00797-L00463	5q31			
137 ±	GLI3 probe 05557-L05451		Exon 2		
142 ±	ROR2 probe 05575-L05452				Exon 1
148 ±	HOXD13 probe 05573-L05005			Exon 1	
154	Reference probe 02409-L03789	16q22			
160	GLI3 probe 05558-L05453		Exon 3		
166	ROR2 probe 05577-L05009				Exon 2
172 ±	HOXD13 probe 05574-L05454			Exon 2	
178 *	Reference probe 16888-L19721	18q21			
184 *	ROR2 probe 16915-L19859				Exon 3
190	GLI3 probe 06148-L04992		Exon 4		
196 *	GLI3 probe 16916-L19860		Exon 5		
202 †	GLI3 probe 05562-L20251		Exon 5		
209	GLI3 probe 05563-L04995		Exon 6		
221 *	ROR2 probe 16917-L19861				Exon 4
229 *	GLI3 probe 16918-L19862		Exon 7		
238 *	Reference probe 02519-L01950	17q11			
247	GLI3 probe 05565-L04997		Exon 8		
256	ROR2 probe 05580-L05012				Exon 5
265	GLI3 probe 05566-L04998		Exon 9		
274 *	Reference probe 08545-L08546	3q24			
281 *	GLI3 probe 16919-L19863		Exon 10		
288 †	GLI3 probe 05567-L20252		Exon 10		
294 †	ROR2 probe 05581-L20253				Exon 6
301	GLI3 probe 05568-L05000		Exon 11		
310	Reference probe 03934-L03389	15q21			
317	GLI3 probe 05569-L05001		Exon 12		
325	ROR2 probe 05582-L05014				Exon 7
337	GLI3 probe 05570-L05002		Exon 13		
346	Reference probe 02324-L01815	19p13			
355	GLI3 probe 05571-L05003		Exon 14		
364	ROR2 probe 05583-L05015				Exon 8
373	GLI3 probe 05572-L05004		Exon 15		
382 *	Reference probe 14642-L16292	1q23			
391 ±	GLI3 probe 05556-L04988		Exon 2		
400 *	ROR2 probe 16920-L19864				Exon 9
409	GLI3 probe 05559-L04991		Exon 3		
418	Reference probe 03065-L02494	4p16			
427	GLI3 probe 05561-L04993		Exon 4		
433 ± *	ROR2 probe 16921-L19865				Exon 1
445 ± *	GLI3 probe 16923-L19867		Exon 1		
453 ± *	GLI3 probe 16922-L20249		Exon 1		
463 *	Reference probe 08479-L20250	22q11			

± This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

* New in version B1 (from lot B1-0611 onwards).

† Changed in version B1 (from lot B1-0611 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

SALSA MLPA P180-B1 Limb-2 / Heart probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position			
		reference	SALL1	SALL4	TBX5
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA				
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation				
100	X-fragment: Specific for the X chromosome				
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome				
127	Reference probe 00797-L00093	5q31			
134	Reference probe 03571-L02375	7q31			
140	SALL4 probe 05681-L05123			Exon 1	
148	TBX5 probe 05692-L05134				Exon 8
154	Reference probe 00580-L00145	8q24			
160	TBX5 probe 05694-L05136				Exon 9
166	TBX5 probe 06207-L05127				Exon 1
174	TBX5 probe 05696-L05138				Exon 10
184	TBX5 probe 05687-L05129				Exon 3
193 ¥	SALL4 probe 05682-L17147			Exon 2	
199 ¥	TBX5 probe 05688-L17144				Exon 4
206 ¥	Reference probe 03140-L17145	14q22			
213 ¥	TBX5 probe 05689-L17146				Exon 5
220	SALL1 probe 05679-L05121		Exon 3 (2)		
228	SALL1 probe 06208-L05120		Exon 1		
239	Reference probe 02883-L02350	19q13			
247	TBX5 probe 05691-L05133				Exon 7
255	SALL4 probe 05683-L05125			Exon 3	
265	TBX5 probe 05693-L05135				Exon 8
274 *	Reference probe 09493-L09750	11q24			
283	TBX5 probe 05695-L05137				Exon 9
292 *	Reference probe 03796-L03237	21q22			
303	TBX5 probe 05697-L05139				Exon 10
317	TBX5 probe 05686-L05128				Exon 2
326	SALL4 probe 05684-L05126			Exon 4	
337	Reference probe 03195-L02652	17q23			
346	TBX5 probe 06209-L05132				Exon 6
373 *	SALL1 probe 15030-L17302		Exon 4 (3)		
382 *	Reference probe 06446-L05972	3p12			

* New in version B1 (from lot 0110 onwards).

¥ Changed in version B1 (from lot 0110 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

Note

- **The TBX5 exon numbering has changed as compared to older versions of this P180 Limb2 product description.** From description version 9 onwards, we have adopted the NCBI exon numbering that is present in the NM_ sequences for the TBX5 gene. This exon numbering might be different as compared to literature! The old exon numbering used can be found between brackets in Table 1.

SALSA MLPA P187-B2 Holoprosencephaly probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position						
		ref.	GLI2	ZIC2	SHH	TGIF1	SIX2/3	other
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA							
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation							
100	X-fragment: Specific for the X chromosome							
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome							
122 X ∞	SIX2 probe S0261-SP0036-L09136							Exon 2
130 ∞	ZIC2 probe 08300-L08262			Exon 3				
136 ∞	SHH probe 06358-L05874				Exon 2			
142	TGIF1 probe 06368-L05884					Exon 8		
148	PTCH1 probe 03707-L03161							Exon 20
154	GLI2 probe 10275-L10787		Upstream					
160 ∞	GLI2 probe 10276-L10788		Exon 12					
166	GLI2 probe 10277-L10789		Exon 2					
171	Reference probe 09494-L09751	11q24						
178 ∞	GLI2 probe 10278-L10790		Exon 13					
184 ∞	SHH probe 06801-L06396				Exon 1			
190	Reference probe 10484-L11037	11q13						
195	GLI2 probe 10279-L10791		Upstream					
202 +	TRAPPC10 probe 07694-L07418							Exon 7
208	TGIF1 probe 06369-L05885					Exon 9		
214 ∞	SIX3 probe 06363-L05879						Exon 1	
220	GLI2 probe 10280-L12843		Exon 8					
232	GLI2 probe 10282-L10794		Exon 5					
238 ∞	SHH probe 06357-L05873				Exon 1			
247 +	TRAPPC10 probe 07695-L07419							Exon 21
256	FBXW11 probe 07624-L07308							Exon 8
265	GLI2 probe 10283-L10795		Exon 1					
274	GLI2 probe 10284-L12844		Exon 9					
283	GLI2 probe 10285-L10797		Exon 6					
292	TGIF1 probe 06366-L05882					Exon 3		
301	FBXW11 probe 07625-L07309							Exon 14
310	Reference probe 09245-L09435	7q22						
318 ∞	ZIC2 probe 06370-L05886			Exon 1				
337	GLI2 probe 10291-L10803		Exon 8					
346*	TGIF1 probe 12817-L06800					Exon 9		
355	GLI2 probe 10293-L10805		Exon 1					
364	GLI2 probe 10294-L10806		Exon 7					
373 * ∞	SIX2 probe 12818-L06803						Exon 1	
382 ∞	GLI2 probe 10295-L10807		Exon 10					
391 *	GLI2 probe 12815-L12842		Exon 3					
398 ∞	ZIC2 probe 06372-L05888			Exon 3				
409	FBXW11 probe 07623-L07307							Exon 2
418	GLI2 probe 10296-L10808		Exon 4					
427 ∞	GLI2 probe 10297-L10809		Exon 11					
436 ∞	SIX3 probe 06362-L05878						Exon 1	
445	TGIF1 probe 06367-L05883					Exon 6b		
454	Reference probe 08479-L08490	22q11						
463 ∞	SIX3 probe 06364-L05880						Exon 2	
478 * ∞	SHH probe 12816-L21224				Exon 3			
485	Reference probe 06349-L21225	1p21						
494	Reference probe 10218-L21226	7q22						

X This probe consists of three parts and has two ligation sites.

* New in version B2 (from lot B2-0911 onwards).

+ New gene name. Previous name for TRAPPC10 is TMEM1.

∞ This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

Note: Exon numbering used here may differ from literature! Please notify us of any mistakes. The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

SALSA MLPA P245-B1 Microdeletion-1 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Syndrome
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)		
118 *	Y-fragment S0135-L16766: Specific for the Y chromosome		
130 ±	TNFRSF4 probe 02269-L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	GATA3 probe 07632-L07317	10p14	DiGeorge region 2 (10p)
142	PAFAH1B1 probe 04120-L03532	17p13.3	Miller-Dieker syndrome
148	MECP2 probe 09310-L13824	Xq28	RETT syndrome / Xq28 duplication
154 ¥	NSD1 probe 02595-L23366	5q35.3	Sotos syndrome
160 ± ¥	GABRD probe 04690-L04068	1p36.33	1p36 deletion syndrome
166 *	UBE3A probe 10877-L11547	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
172 ±	CREBBP probe 03087-L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi gene
178 ¥	GNB1 probe 02890-L02511	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184 *	MECP2 probe 15319-L17592	Xq28	RETT syndrome, Xq28 duplication
190 *	SEMA7A probe 18316-L23369	15q24	15q24 microdeletion syndrome
196	CLDN5 probe 01218-L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202 ± ¥	MECP2 probe 03409-L16570	Xq28	RETT syndrome, Xq28 duplication
208 ± ¥	GP1BB probe 05464-L15184	22q11.21	DiGeorge syndrome
214 *	MBD5 probe 15311-L17110	2q23.1	2q23.1 microdeletion syndrome
220 *	PPIL2 probe 07530-L22697	22q11.21	Distal 22q11 syndrome
226 *	REL probe 17474-L22693	2p16.1	2p16.1 microdeletion syndrome
232 ±	LETM1 probe 04190-L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn syndrome
238	PAFAH1B1 probe 16348-L22830	17p13.3	Miller-Dieker syndrome / Lissencephaly
244 *	SNRPN probe 12178-L13826	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
252 *±	SHANK3 probe 12031-L13828	22q13.33	Phelan-McDermid syndrome
260 *	NF1 probe 11732-L13830	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
265 *±	RTDR1 probe 08484-L22698	22q11.22	Distal 22q11 syndrome
272 *	MAPT probe 08365-L22699	17q21.31	17q21 microdeletion syndrome
278 ¥	LRRC48 probe 01452-L20745	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283 *	SEMA5A probe 14265-L22700	5p15.31	Cri du Chat syndrome
292 *	DMD probe 01411-L23371	Xp21.1	X chromosome copy number
300 ¥	SNRPN probe 01318-L23196	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
307 ± ¥	LLGL1 probe 01453-L22689	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
315 *	ELN probe 16349-L22813	7q11.23	Williams-Beuren syndrome
323 *	PTCH1 probe 03702-L22814	9q22.32	9q22.3 microdeletion syndrome
331 ¥	CYP1A1 probe 06811-L22815	15q24.1	15q24 microdeletion syndrome
339 *	NF1 probe 02507-L22694	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
346 *	KANSL1 probe 18172-L22729	17q21.31	17q21.31 microdeletion syndrome
355	DLG1 probe 08395-L08249	3q29	3q29 microdeletion syndrome
364	ELN probe 01336-L00878	7q11.23	Williams-Beuren syndrome
373 *	SNAP29 probe 16748-L19368	22q11.21	DiGeorge syndrome
382 *	RABL2B probe 06734-L05558	22q13.33	Phelan-McDermid syndrome
391 *	SATB2 probe 15315-L17114	2q33.1	2q33.1 microdeletion syndrome
401 ±	TRPS1 probe 03081-L07411	8q23.3	Langer-Giedion syndrome
411 *	MBD5 probe 15313-L22691	2q23.1	2q23.1 microdeletion syndrome
422 ± ¥	DLG1 probe 08401-L15187	3q29	3q29 microdeletion syndrome
429 *	EXT1 probe 15322-L17698	8q24.11	Langer-Giedion syndrome
436 *	FANCC probe 04460-L22816	9q22.32	9q22.3 microdeletion syndrome
445 ¥	TERT probe 03761-L22817	5p15.33	Cri du Chat syndrome
454 *	WHSC1 probe 10633-L14379	4p16.3	Wolf-Hirschhorn syndrome
462 ¥	NSD1 probe 02600-L15191	5q35.3	Sotos syndrome
471 *	RAI1 probe 11730-L15192	17p11.2	Smith-Magenis syndrome

SALSA MLPA P250-B1 DiGeorge probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		other	22q11
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	PPIL2 probe 07529-L04870		22q11 D-E
136	Reference probe 05059-L07380	EHMT1, 9q34.3	
142	SLC25A18 probe 05457-L07613		22q11 CES
148 ✕	DGCR8 probe 08475-L08486		22q11 A-B
154	Reference probe 05058-L07382	EHMT1, 9q34.3	
160 ✕	HIRA probe 01214-L02328		22q11 A-B
166	SNRPD3 probe 08481-L08492		22q11 G-H
172 ✕†	TBX1 probe 05408-L07614		22q11 A-B
178	MICAL3 probe 05458-L04861		22q11 CES
184	Reference probe 01217-L00694	KLKB1, 4q35	
191 ✕	CLTCL1 probe 05462-L05809		22q11 A-B
196 ✕	CLDN5 probe 01218-L06270		22q11 A-B
202 ✕	ZNF74 probe 05927-L07395		22q11 B-C
208 ✕†	GP1BB probe 05464-L10114		22q11 A-B
215	GNAZ probe 08478-L17067		22q11 E-F
220	SMARCB1 probe 05928-L07969		22q11 F-G
226	USP18 probe 07528-L04863		22q11 CES
232 †	Reference probe 06787-L07383	SHANK3, 22q13	
238 ✕	TXNRD2 probe 01223-L05814		22q11 A-B
245 ✕†*	TBX1 probe 10810-L14347		22q11 A-B
255	Reference probe 01735-L07385	RPH3AL, 17p13.3	
261	RTDR1 probe 08484-L09139		22q11 E-F
267	Reference probe 01225-L09140	GATA3, 10p14, DGR2	
274	Reference probe 01226-L03844	GATA4, 8p23.1	
283 ✕	KLHL22 probe 01227-L05815		22q11 B-C
292 *~	TOP3B probe 13299-L14649		22q11 D-E
301 *	Reference probe 07636-L07321	GATA3, 10p14, DGR2	
308 *	HIC2 probe 13302-L15009		22q11 D-E
316 ✕¥	MED15 probe 01231-L15877		22q11 B-C
326 *	Reference probe 12093-L15011	SLC25A4, 4q35.1	
335 ¥	IL17RA probe 01082-L15012		22q11 CES
342	RAB36 probe 05932-L04872		22q11 E-F
350	Reference probe 01232-L17068	TCEB1P3, 10p14, DGR2	
357	BID probe 01767-L07389		22q11 CES
364	Reference probe 01234-L00781	CELF2, 10p14	
373 ✕±	SNAP29 probe 01235-L00773		22q11 C-D
382	Reference probe 01522-L00952	CELF2, 10p14	
391 *	Reference probe 13603-L03531	YWHAE, 17p13.3	
400	SMARCB1 probe 05933-L05812		22q11 F-G
409	Reference probe 01238-L07390	GEMIN4, 17p13.3	
418 ✕±	LZTR1 probe 01521-L00951		22q11 C-D
427	Reference probe 01240-L00787	MSRA, 8p23.1	
436	Reference probe 04081-L03465	RPH3AL, 17p13.3	
445	Reference probe 01093-L00661	ARSA, 22q13	
454	RTDR1 probe 08479-L08490		22q11 E-F
465 ✕	CDC45L probe 05463-L05808		22q11 A-B
472	Reference probe 01243-L07392	PPP1R3B, 8p23.1	
487 ¥	Reference probe 08480-L15878	NEBL, 10p12.31, DGR2	

* New in version B1 (from lot 0210 onwards)

¥ Changed in version B1 (from lot 0210 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

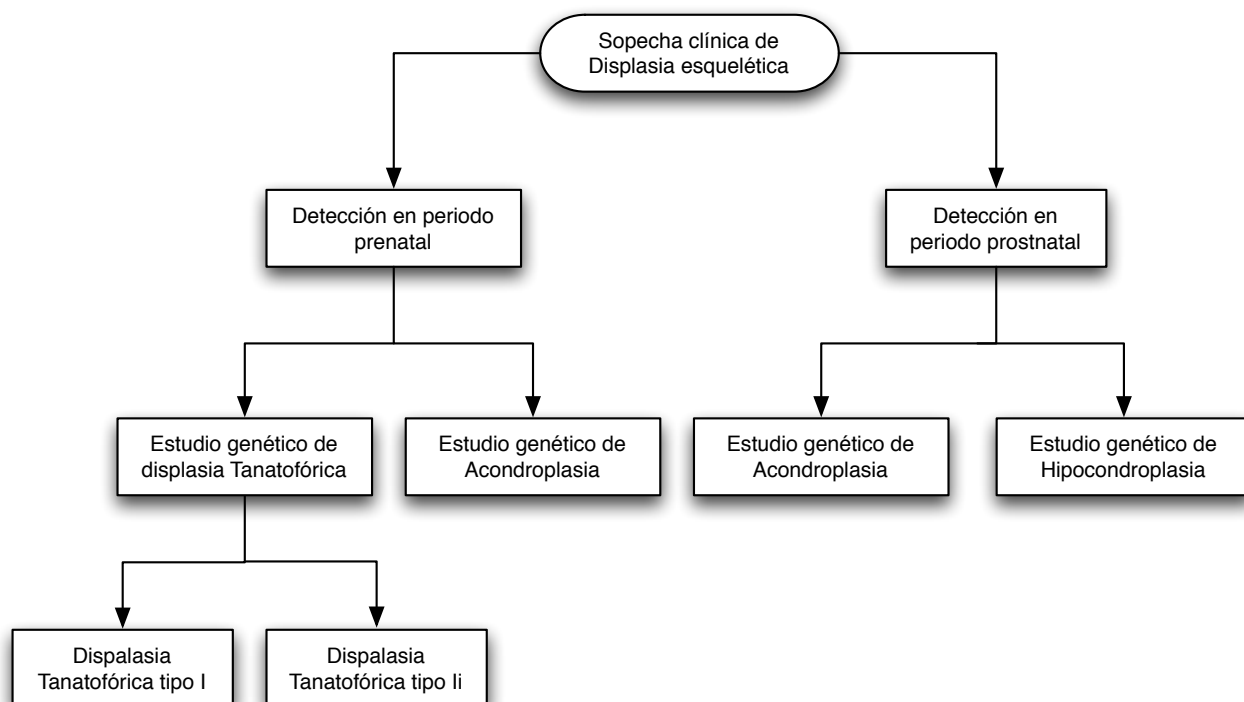
SALSA MLPA P325-A1 OCA2 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	OCA2	TYR
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 05712-L05712	1q21		
136	TYR probe 14277-L15947			Exon 5
141	OCA2 probe 14278-L15948		Exon 16	
148	OCA2 probe 14279-L15949		Exon 3	
154	TYR probe 14280-L16600			Exon 2
160	TYR probe 14285-L15955			Exon 3
166	OCA2 probe 14281-L15951		Exon 13	
172	OCA2 probe 14282-L16601		Exon 6	
178	OCA2 probe 14283-L15953		Exon 2	
184	Reference probe 16915-L19859	9q22		
191 *	OCA2 probe 14284-L16595		Intron 6	
200	OCA2 probe 14286-L16602		Exon 24	
207	OCA2 probe 14287-L15957		Exon 18	
214	OCA2 probe 14288-L15958		Exon 4	
220	OCA2 probe 14289-L15959		Exon 17	
226	OCA2 probe 15003-L17557		Intron 23	
232 *	OCA2 probe 14291-L17801		Exon 7	
238	OCA2 probe 14292-L18689		Exon 10	
244	OCA2 probe 14293-L15963		Exon 14	
250	OCA2 probe 14294-L15964		Exon 15	
256	OCA2 probe 14295-L16479		Exon 11	
260 *	OCA2 probe 14296-L15966		Intron 7	
267	Reference probe 14110-L15943	8p21		
274	Reference probe 05989-L05414	20p12		
283	OCA2 probe 14297-L15967		Exon 9	
292	OCA2 probe 14298-L15968		Exon 12	
300	OCA2 probe 14299-L15969		Exon 5	
313	TYR probe 14300-L15970			Exon 1
328	OCA2 probe 14301-L15971		Exon 19	
337	Reference probe 01659-L01241	17p13		
346	OCA2 probe 14302-L15972		Exon 20	
355	TYR probe 14303-L15973		Exon 4	
385	Reference probe 05914-L05359	18p11		Exon 4
400	OCA2 probe 14790-L01553		Exon 22	
409	Reference probe 10681-L11263	6p12		
418	OCA2 probe 14307-L15977		Exon 21	
427	Reference probe 14406-L16088	12q13		
436	Reference probe 04720-L04138	7q21		
445	OCA2 probe 02041-L03725		Exon 1	
454	Reference probe 08479-L08490	22q11		
463 *	OCA2 probe 14308-L15978		Intron 6	
472	Reference probe 12761-L13877	4q12		

* Probe present either near or within the 2.7-kb deletion area.

Note: Exon numbering used here may differ from literature! Please notify us of any mistakes. The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

ANEXO IV: DISPLASIAS ESQUELÉTICAS: diagnóstico de rutina



Codón gen <i>FGFR3</i>	Exón del gen <i>FGFR3</i>	Displasia esquelética
248, 249, 250	7	Tanatofórica tipo I
328	9	Hipocondroplasia
346	9	Acondroplasia
370, 371, 373	10	Tanatofórica tipo I
375, 380, 394	10	Acondroplasia
538, 540	14	Hipoacondroplasia
650	15	Hipocondroplasia, Tanatofórica tipo I, Tanatofórica tipo II
807	19	Tanatofórica tipo I

ANEXO V: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS



HOJA DE INFORMACIÓN PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN DE

ETIQUETA IDENTIFICATIVA PACIENTE

SERVICIO: GENÉTICA

MEDICO RESPONSABLE:

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

PROPORCIONA ESTE CONSENTIMIENTO:

DIAGNÓSTICO:.....

PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO PROPUESTO: ☐ Estudio Genético Molecular
☐ Estudio Citogenético
☐ Investigación

ESTUDIO GENÉTICO DE

■ OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL ESTUDIO:

Las enfermedades de base genética son una de las principales causas de mortalidad, discapacidad y dependencia en los países desarrollados.

En el momento actual se dispone del conocimiento obtenido del proyecto genoma humano, y existe un gran desarrollo de las herramientas biotecnológicas.

Por ello, el estudio de las causas embriológicas, fisiopatológicas y genéticas de estos procesos desde distintos puntos de vista, permitirá una prevención, diagnóstico y tratamiento más eficaces, con el objetivo final de disminuir la prevalencia y la morbilidad de estos procesos.

Nos proponemos identificar la causa genética de presente en Vd. o su familia. La participación en este estudio diagnóstico es voluntaria y no supone ningún riesgo para usted.

En este caso se trata de un estudio: ☐ Diagnóstico ☐ Predictivo ☐ Portador

Su participación en este estudio es voluntaria, no supone ningún riesgo para usted y puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre esta enfermedad.

El Servicio de Genética Médica de la Fundación Jiménez Díaz-Capio se dedica al diagnóstico, prevención e investigación de las bases moleculares y celulares de las enfermedades hereditarias desde hace más de 25 años.

Su equipo, médicos y biólogos especialistas acreditados por la Asociación Española de Genética Humana, realizan estos estudios, siguiendo las normas de calidad y acreditación vigentes y recomendadas nacional (AEDP, AEGH) e internacionalmente (ESHG, EMQN).

El Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz-Capio participa en proyectos de investigación realizando los estudios genéticos que permitirán conocer mejor el posible papel de los genes relacionados con su enfermedad.

Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades. Hasta el momento hemos realizado estudios similares con otros genes implicados en las patologías hereditarias y los resultados han contribuido de forma global a conocer sus causas, mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar una prevención, diagnóstico y tratamiento más rápido y eficaz disminuyendo la frecuencia y gravedad de las mismas.

■ DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

El procedimiento a seguir es el habitual para el diagnóstico y el consejo genético, solicitados por Vd., su familiar o su médico, para la evaluación clínica de la enfermedad:

A) Una consulta para recoger sus antecedentes, personales y familiares, y poder elaborar su árbol genealógico.

B) La obtención de una muestra biológica (de 5 a 20 ml de sangre venosa o el cepillado del interior de la mejilla/saliva para la obtención de células bucales).

MUESTRAS BIOLÓGICAS

A partir de las muestras biológicas, se extraerá el material genético necesario para el estudio (ADN y/o ARN) y/o se cultivarán los linfocitos (células existentes en la sangre) para la obtención de cromosomas.

Nosotros protegeremos la confidencialidad de las muestras asignándoles un código específico. Su muestra solo será identificada a través del código que la ligará a usted. La decodificación solo podrá ser llevada a cabo por el facultativo responsable o la persona autorizada por él.

1.- Una pequeña parte de este material se utilizará para el análisis diagnóstico de los genes en estudio, relacionados con su patología.

Si Vd. acepta sólo los estudios genéticos descritos en este punto, su muestra se destruirá después de completar las pruebas.

2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en un futuro.

Si autoriza el almacenamiento, la muestra codificada se guardará de forma adecuada durante un periodo de hasta 20 años, en nuestro banco de ADN, en la Fundación Jiménez Díaz-Capio.

3.- Vd. debe decidir el destino que debemos dar a su muestra al término de esta investigación (puntos 1 y 2) y comunicárnoslo mediante el Consentimiento Informado.

Su muestra podría ser destruida, ser anonimizada (perderá los identificadores que la ligan a Vd. y por tanto no podrá ser localizada ni destruida) o ser almacenada hasta su posible incorporación a un nuevo estudio, para lo que necesariamente nuestro equipo tendría que ponerse en contacto con Vd., informarle y solicitarle un nuevo consentimiento.

BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR:

La información que se produzca podría ser útil para su salud y la de su familia. Nosotros también esperamos que los resultados obtenidos nos permitan ampliar nuestros conocimientos en las enfermedades de base genética y posiblemente contribuir al beneficio de la sociedad en general.

Tiene Vd. derecho a conocer los resultados genéticos individuales y/o generales confirmados que se obtengan del análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva.

RIESGOS Y ALTERNATIVAS:

Aun cuando la toma de la muestra de sangre no cause problemas serios, ésta puede ocasionar un poco de sangrado, magulladura, desvanecimiento, vértigo, infección y/o molestia en el sitio de la inyección.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud, en ese caso se le entregaría un informe genético explicándole la implicación clínica que tiene la alteración genética identificada, en una consulta de “Consejo Genético”.

Vd. debe advertir a los investigadores en caso de NO QUERER ser informado.

La información obtenida podría tener consecuencias para sus familiares. En ese caso sería conveniente que Vd. mismo les transmitiera dicha información.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

El proyecto de investigación está financiado con fondos españoles del Ministerio de Ciencia e Innovación español (ISCIII) y/u otros (Mutua Madrileña, Merck Serono, etc.). Ni los investigadores ni los participantes en el estudio percibirán remuneración económica alguna por su participación.

CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN

Toda la información (datos personales, clínicos, genéticos, etc.) será recogida y tratada de forma estrictamente confidencial por todo el personal y, respetará en todo momento lo establecido por la legislación aplicable y regulaciones vigentes en materia de, protección de datos de carácter personal y principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas. (Entre otras: Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente, Ley 14/1986 General de Sanidad y Ley 14/2007 de Investigación Biomédica). Únicamente el código permitirá a los investigadores responsables de la Fundación Jiménez Díaz hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes.

Estos datos formarán parte de un fichero automatizado y/o manual cuya finalidad es la de gestionar su historia clínica y que estará ubicado en la Fundación Jiménez Díaz. El responsable del fichero es la Dirección Médica de la Fundación Jiménez Díaz con domicilio en la Avda/ Reyes Católicos nº 2 Madrid (28040), donde podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que en aplicación de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos legalmente le asisten.

Ninguno de sus datos personales será transferido, únicamente algunos de los datos clínicos, codificados y sin ninguna identificación personal serán introducidos en bases de datos restringidas a la que sólo los investigadores (de EVI-GENORET, Kbaret, E-Rare u otros) pueden acceder.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniendo una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para el estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki, los contenidos de la Declaración Universal de la UNESCO, y la ratificación del Convenio para la Protección de los Derechos Humanos y la Dignidad del Ser Humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina; BOE n. 251 de 20/10/1999).

Tómese el tiempo necesario para reflexionar sobre su decisión y discuta su participación en el proyecto con personas cercanas a Vd. antes de darnos su respuesta.

Le comunicamos que su decisión, sea cual sea, no afectará a su atención médica o la de sus familiares.

Si se dispone de nueva información que pueda ser relevante para su decisión de participar en el estudio, Vd. será informado.

Su participación en este estudio es completamente libre y voluntaria. Vd. puede decidir no participar y, estará en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Para ello deberá contactar con algún miembro del equipo investigador e indicar su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales.

Tal como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de Consentimiento Informado.

COPIA PARA EL PACIENTE

CONSENTIMIENTO

Proporciona la información y este consentimiento:.....

Yo, D./Dª con DNI
como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE
☐ REPRESENTANTE LEGAL:.....de.....
☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de.....

Declaro bajo mi responsabilidad que:

- He/ha recibido una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia firmada de este Consentimiento Informado.

- He/ha leído la Hoja de Información que se me/le ha entregado sobre el estudio.
- He/ha podido hacer preguntas sobre el estudio, he/ha recibido suficiente información sobre el estudio y la he/ha comprendido.
- Comprendo/e que la participación es voluntaria.
- He/ha tenido tiempo para reflexionar sobre mi/su decisión antes de dar el consentimiento.
- Comprendo/e que puedo/e retirarme/se del estudio:
 - 1) Cuando quiera.
 - 2) Sin tener que dar explicaciones.
 - 3) Sin que esto repercuta en mis/sus cuidados médicos.

Presto/a libremente mi/su conformidad para que (Marque con una X la parte del estudio a la que dé consentimiento):

Punto 1.- ☐ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación conen mi/su muestra de ADN.

- ☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 2.- ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con esta patología.

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

☐ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

☐ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico responsable
	Nombre y Apellidos: Nº Colegiado:
Fecha	Fecha

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./D^a con DNI
como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE
☐ REPRESENTANTE LEGAL: de
☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de

revoco/a libremente el consentimiento informado firmado en el presente documento para:

Punto 1.- ☐ realizarse el análisis diagnóstico en relación con en mi/su muestra de ADN.

- ☐ ser informado/a del resultado del diagnóstico genético.

Punto 2.- ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con.....

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

☐ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

Por ello deseo que mis muestras:

☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

☐ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo de la revocación oral	Firma del médico responsable Nombre y Apellidos: Nº Colegiado:
Fecha	Fecha

CAMBIO DE MÉDICO

Yo, D./D^a con DNI
como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE
☐ REPRESENTANTE LEGAL: de
☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de

manifiesto/a conocer y autorizo/a que el médico designado para realizar el procedimiento que me ha sido propuesto sea el Dr:.....

Manifiesto mi autorización al cambio de médico propuesto, Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico que va a realizar el procedimiento Nombre y Apellidos: Nº Colegiado:
Fecha	Fecha



Anatomía Patológica
Tfno.: 91-543-49-35
Fax: 91-549-12-90
E mail: patologia@fjd.es

AUTORIZACION DE ESTUDIO NECROPSICO DE FETOS

D.:

Padre/Madre:

Autorizo el estudio necrópsico del feto de semanas.....
asistido en la Fundación Jiménez Díaz, el día de
de, en la cama, servicio de
para llegar al conocimiento objetivo y científico de su enfermedad y de
sus causas, quedando enterado de que se procederá a la incineración
de los restos una vez concluido el estudio y concediendo la autorización
para ello.

Fecha: Firma:

DNI/Pasaporte:



**HOJA DE INFORMACIÓN PARA
DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN DE
MALFORMACIONES CONGÉNITAS**

ETIQUETA IDENTIFICATIVA PACIENTE

SERVICIO: GENÉTICA

MEDICO RESPONSABLE:

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

PROPORCIONA ESTE CONSENTIMIENTO:

DIAGNÓSTICO:.....

PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO PROPUESTO:

- ☐ Estudio Genético Molecular
☐ Estudio Citogenético
☐ Investigación

ESTUDIO GENÉTICO DE MALFORMACIONES CONGÉNITAS

▪ **OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL ESTUDIO:**

Las enfermedades de base genética son una de las principales causas de mortalidad, discapacidad y dependencia en los países desarrollados.

En el momento actual se dispone del conocimiento obtenido del proyecto genoma humano, y existe un gran desarrollo de las herramientas biotecnológicas.

Por ello, el estudio de las causas embriológicas, fisiopatológicas y genéticas de estos procesos desde distintos puntos de vista, permitirá una prevención, diagnóstico y tratamiento más eficaces, con el objetivo final de disminuir la prevalencia y la morbilidad de estos procesos.

Nos proponemos identificar la causa genética de la malformación congénita presente en Vd. o su familia. La participación en este estudio diagnóstico es voluntaria y no supone ningún riesgo para usted.

En este caso se trata de un estudio: ☐ Diagnóstico ☐ Predictivo ☐ Portador ☐ Investigación

Su participación en este estudio es voluntaria, no supone ningún riesgo para usted y puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre esta enfermedad.

El Servicio de Genética Médica de la Fundación Jiménez Díaz-Capio se dedica al diagnóstico, prevención e investigación de las bases moleculares y celulares de las enfermedades hereditarias desde hace más de 25 años.

Su equipo, médicos y biólogos especialistas acreditados por la Asociación Española de Genética Humana, realizan estos estudios, siguiendo las normas de calidad y acreditación vigentes y recomendadas nacional (AEDP, AEGH) e internacionalmente (ESHG, EMQN).

El Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz-Capio participa en proyectos de investigación realizando los estudios genéticos que permitirán conocer mejor el posible papel de los genes relacionados con su enfermedad.

Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades. Hasta el momento hemos realizado estudios similares con otros genes implicados en las patologías hereditarias y los resultados han contribuido de forma global a conocer sus causas, mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar una prevención, diagnóstico y tratamiento más rápido y eficaz disminuyendo la frecuencia y gravedad de las mismas.

▪ **DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:**

El procedimiento a seguir es el habitual para el diagnóstico y el consejo genético, solicitados por Vd., su familiar o su médico, para la evaluación clínica de la enfermedad:

A) Una consulta para recoger sus antecedentes, personales y familiares, y poder elaborar su árbol genealógico.

B) La obtención de una muestra biológica (de 5 a 20 ml de sangre venosa o el cepillado del interior de la mejilla/saliva para la obtención de células bucales).

MUESTRAS BIOLÓGICAS

A partir de las muestras biológicas, se extraerá el material genético necesario para el estudio (ADN y/o ARN) y/o se cultivarán los linfocitos (células existentes en la sangre) para la obtención de cromosomas.

Nosotros protegeremos la confidencialidad de las muestras asignándoles un código específico. Su muestra solo será identificada a través del código que la ligará a usted. La decodificación solo podrá ser llevada a cabo por el facultativo responsable o la persona autorizada por él.

1.- Una pequeña parte de este material se utilizará para el análisis diagnóstico de los genes en estudio, relacionados con su patología.

Si Vd. acepta sólo los estudios genéticos descritos en este punto, su muestra se destruirá después de completar las pruebas.

2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en un futuro.

Si autoriza el almacenamiento, la muestra codificada se guardará de forma adecuada durante un periodo de hasta 20 años, en nuestro banco de ADN, en la Fundación Jiménez Díaz-Capio.

3.- Vd. debe decidir el destino que debemos dar a su muestra al término de esta investigación (puntos 1 y 2) y comunicárnoslo mediante el Consentimiento Informado.

Su muestra podría ser destruida, ser anonimizada (perderá los identificadores que la ligan a Vd. y por tanto no podrá ser localizada ni destruida) o ser almacenada hasta su posible incorporación a un nuevo estudio, para lo que necesariamente nuestro equipo tendría que ponerse en contacto con Vd., informarle y solicitarle un nuevo consentimiento.

BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR:

La información que se produzca podría ser útil para su salud y la de su familia. Nosotros también esperamos que los resultados obtenidos nos permitan ampliar nuestros conocimientos en las enfermedades de base genética y posiblemente contribuir al beneficio de la sociedad en general.

Tiene Vd. derecho a conocer los resultados genéticos individuales y/o generales confirmados que se obtengan del análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva.

RIESGOS Y ALTERNATIVAS:

Aun cuando la toma de la muestra de sangre no cause problemas serios, ésta puede ocasionar un poco de sangrado, magulladura, desvanecimiento, vértigo, infección y/o molestia en el sitio de la inyección.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud, en ese caso se le entregaría un informe genético explicándole la implicación clínica que tiene la alteración genética identificada, en una consulta de “Consejo Genético”.

Vd. debe advertir a los investigadores en caso de NO QUERER ser informado.

La información obtenida podría tener consecuencias para sus familiares. En ese caso sería conveniente que Vd. mismo les transmitiera dicha información.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

El proyecto de investigación está financiado con fondos españoles del Ministerio de Ciencia e Innovación español (ISCIII) y/u otros (Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad de Madrid, Mutua Madrileña, Merck Serono, etc.). Ni los investigadores ni los participantes en el estudio percibirán remuneración económica alguna por su participación.

CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN

Toda la información (datos personales, clínicos, genéticos, etc.) será recogida y tratada de forma estrictamente confidencial por todo el personal y, respetará en todo momento lo establecido por la legislación aplicable y regulaciones vigentes en materia de, protección de datos de carácter personal y principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas. (Entre otras: Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente, Ley 14/1986 General de Sanidad y Ley 14/2007 de Investigación Biomédica). Únicamente el código permitirá a los investigadores responsables de la Fundación Jiménez Díaz hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes.

Estos datos formarán parte de un fichero automatizado y/o manual cuya finalidad es la de gestionar su historia clínica y que estará ubicado en la Fundación Jiménez Díaz. El responsable del fichero es la Dirección Médica de la Fundación Jiménez Díaz con domicilio en la Avda/ Reyes Católicos nº 2 Madrid (28040),

Ninguno de sus datos personales será transferido, únicamente algunos de los datos clínicos, codificados y sin ninguna identificación personal serán introducidos en bases de datos restringidas a la que sólo los investigadores (de EVI-GENORET, Kbare, E-Rare u otros) pueden acceder.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniendo una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para el estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki, los contenidos de la Declaración Universal de la UNESCO, y la ratificación del Convenio para la Protección de los Derechos Humanos y la Dignidad del Ser Humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina; BOE n. 251 de 20/10/1999).

Tómese el tiempo necesario para reflexionar sobre su decisión y discuta su participación en el proyecto con personas cercanas a Vd. antes de darnos su respuesta.

Le comunicamos que su decisión, sea cual sea, no afectará a su atención médica o la de sus familiares.

Si se dispone de nueva información que pueda ser relevante para su decisión de participar en el estudio, Vd. será informado.

Su participación en este estudio es completamente libre y voluntaria. Vd. puede decidir no participar y, estará en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Para ello deberá contactar con algún miembro del equipo investigador e indicar su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales.

Tal como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de Consentimiento Informado.

COPIA PARA EL PACIENTE

CONSENTIMIENTO

Proporciona la información y este consentimiento:.....

Yo, D./D^a con DNI
como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE
☐ REPRESENTANTE LEGAL:.....de.....
☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de.....

Declaro bajo mi responsabilidad que:

- He/ha recibido una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia firmada de este Consentimiento Informado.

- He/ha leído la Hoja de Información que se me/le ha entregado sobre el estudio.
- He/ha podido hacer preguntas sobre el estudio, he/ha recibido suficiente información sobre el estudio y la he/ha comprendido.
- Comprendo/e que la participación es voluntaria.
- He/ha tenido tiempo para reflexionar sobre mi/su decisión antes de dar el consentimiento.
- Comprendo/e que puedo/e retirarme/se del estudio:
 - 1) Cuando quiera.
 - 2) Sin tener que dar explicaciones.
 - 3) Sin que esto repercuta en mis/sus cuidados médicos.

Presto/a libremente mi/su conformidad para que (Marque con una X la parte del estudio a la que dé consentimiento):

Punto 1.- ☐ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación conen mi/su muestra de ADN.

- ☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 2.- ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con esta patología.

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

☐ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

☐ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico responsable
	Nombre y Apellidos: Nº Colegiado:
Fecha	Fecha

REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./D^a con DNI
como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE
☐ REPRESENTANTE LEGAL: de
☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de

revoco/a libremente el consentimiento informado firmado en el presente documento para:

Punto 1.- ☐ realizarse el análisis diagnóstico en relación con en mi/su muestra de ADN.

- ☐ ser informado/a del resultado del diagnóstico genético.

Punto 2.- ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 20 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 3.- ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

Punto 4. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

☐ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

Por ello deseo que mis muestras:

☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

☐ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo de la revocación oral	Firma del médico responsable
	Nombre y Apellidos: Nº Colegiado:
Fecha	Fecha

CAMBIO DE MÉDICO

Yo, D./D^a con DNI
como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE
☐ REPRESENTANTE LEGAL: de
☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de

manifiesto/a conocer y autorizo/a que el médico designado para realizar el procedimiento que me ha sido propuesto sea el Dr:

Manifiesto mi autorización al cambio de médico propuesto, Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del médico que va a realizar el procedimiento
	Nombre y Apellidos: Nº Colegiado:
Fecha	Fecha

ANEXO VI: COMPENDIO DE PUBLICACIONES



Ellis-van Creveld syndrome in a fetus with rhizomelia and polydactyly. Report of a case diagnosed by genetic analysis, and correlation with pathological andradiologic findings.

Ezcurra-Perailta and Martinez-García et al. Gene. 2012;499(1):223-5.

Oculodentodigital dysplasia: genetic counselling, reproductive expectatives and molecular assay of a clinical case referred to preimplantational diagnosis.

Martinez-García et al. Med Clin (Barc). 2012;138(13):592-3

Broadening our understanding by the use of molecular cytogenetic techniques: full monosomy 21.

Martinez-García et al. J Assist Reprod Genet. 2011;28(7):621-6.

Holt-Oram syndrome: study of 7 cases.

Martinez-García et al. Med Clin (Barc). 2010 Nov 13;135(14):653-7.

Identification of a novel deletion in the OA1 gene: report of the first Spanish family with X-linked ocular albinism.

Martinez-García et al. Clin Experiment Ophthalmol. 2010 Jul;38(5):489-95.

Novel human pathological mutations. Gene symbol: CRB1. Disease: Leber congenital amaurosis.

Hum Genet. 2010 Jan;127(1):119.

Novel human pathological mutations. Gene symbol: ABCA4. Disease: Stargardt disease.

Hum Genet. 2009 Aug;126(2):341.

Novel human pathological mutations. Gene symbol: OA1. Disease: albinism, ocular.

Hum Genet. 2009 Apr;125(3):349.